



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

***EFFECTO DE LA ISQUEMIA Y LA REPERFUSIÓN EN  
LA EXPRESIÓN DE LA HEMOXIGENASA-2 EN UN  
MODELO IN VIVO DE ISQUEMIA CEREBRAL***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

JORGE MUÑOZ SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Blas Lotina Hensen.

**VOCAL:** Profesor: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez.

**SECRETARIO:** Profesor: María Elena Chánez Cárdenas.

**1er. SUPLENTE:** Profesor: José Pedraza Chaverri.

**2° SUPLENTE:** Profesor: Samuel Canizales Quinteros.

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA**

**"MANUEL VELASCO SUÁREZ"**

**ASESOR DEL TEMA**

**DRA. MARÍA ELENA CHÁNEZ CÁRDENAS**

---

**SUSTENTANTE**

**JORGE MUÑOZ SÁNCHEZ**

---

## ÍNDICE

<b>I. ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>II. RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1. Fisiopatología de la Enfermedad Vascul ar Cerebral (EVC) .....	5
1.1. Epidemiología .....	5
1.2. Clasificación de la EVC.....	6
1.3 Etiología, factores de riesgo y sintomatología de la EVC isquémica.	7
1.4. Isquemia cerebral: zonas de infarto y penumbra. ....	9
1.5. Aspectos Bioquímicos de la EVC isquémica.....	11
1.5.1 Interrupción de energía celular .....	12
1.5.2 Interrupción de las bombas de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> /H <sup>+</sup> dependientes de ATP.....	12
1.5.3 Mecanismos de excitotoxicidad por Glutamato y efectos tóxicos del Ca <sup>2+</sup> .....	13
1.5.4 Producción de ERO, ERN y estrés oxidativo.....	14
1.5.5 Muerte Celular. ....	17
1.5.6 Daño por reperfusión e inflamación .....	19
1.5.7 Mecanismos de adaptación y respuesta celular ante un evento de Isquemia-Reperfusión.....	21
2. Modelos de isquemia cerebral focal.....	25
2.1 Modelo de oclusión de la arteria cerebral media (OACM) .....	26
3. El Sistema Hemoxigenasa (HO).....	27
3.1 HO-1.....	30
3.2 HO-2.....	31
3.3 El grupo hemo y su reacción de degradación catalizada por el sistema HO. ....	35
3.4 Metabolitos del sistema HO.....	36
3.4.1 Biliverdina y Bilirrubina.....	36
3.4.2 CO .....	37
3.4.3 El Fe <sup>2+</sup> .....	38
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	<b>40</b>

<b>VI. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
OBJETIVO GENERAL .....	40
OBJETIVOS PARTICULARES .....	40
<b>VII. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
1.    Animales .....	41
2.    Oclusión de la ACM .....	41
3.    Diseño experimental .....	41
4.    Determinación del Déficit Neurológico .....	42
5.    Niveles de expresión génica por RT-PCR en tiempo real.....	43
5.1 Aislamiento de ARN total. ....	43
5.2 Síntesis de ADNc .....	43
5.3 Diseño de oligos de HO-2. ....	44
5.4 Ensayo de amplificación preliminar para la HO-2 en PCR de punto final. ....	45
5.5 Curva de disociación del amplicón de la HO-2.....	45
5.6 Análisis de expresión génica por PCR en tiempo real. ....	46
6.    Preparación de microsomas .....	46
7.    Niveles de expresión proteica por <i>western blot</i> .....	47
8.    Actividad enzimática del sistema HO.....	47
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
1.    Amplificación preliminar para la HO-2 en PCR de punto final.....	50
2.    Curva de disociación.....	50
3.    Validación del método de RT-PCR en tiempo real.....	51
4.    Niveles transcripcionales de la HO-2 ante la isquemia-reperfusión. ....	52
5.    Niveles proteicos de la HO-2 ante la isquemia-reperfusión.....	53
6.    Determinación de la actividad enzimática del sistema HO ante la isquemia-reperfusión.....	54
<b>IX. DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
<b>XII. REFERENCIAS .....</b>	<b>65</b>

## I. ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Definición</b>
·OH	Radical hidroxilo.
·NO	Óxido nítrico.
ACM	Arteria Cerebral Media.
ACV	Accidente Cerebral Vascular.
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario.
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico.
AP-1 y 2	Proteína Activadora 1 y 2.
ARE	Elementos de Respuesta Antioxidante.
BHE	Barrera Hematoencefálica.
BR	Bilirrubina.
BV	Biliverdina.
BVR	Bilirrubín reductasa.
CBP-p300	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc.
CK2	Caseína Cinasa-2.
COX 1 y 2	Ciclooxigenasa 1 y 2.
DAG	Diacilglicerol.
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados.
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno.
ERK	Proteína Cinasa regulada por señales extracelulares.
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno.
eNOS	Óxido Nítrico Sintetasa endotelial.
EVC	Enfermedad Vascular Cerebral.
FSC	Flujo Sanguíneo Cerebral.
GC	Guanilato ciclasa.
GMPc	Guanosín Monofosfato cíclico.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno.
HIF1	Factor inducible por hipoxia 1.
HIF1 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia 1 subunidad alfa.
HIF1 $\beta$	Factor inducible por hipoxia 1 subunidad beta.

HO-1	Hemoxigenasa-1.
HO-2	Hemoxigenasa-2.
HRE	Elementos de Respuesta a Hipoxia.
HRM	Motivos Reguladores de Hemo.
IgG-HRP	Inmunoglobulina G conjugada con peroxidasa de rábano.
iNOS	Óxido Nítrico Sintetasa inducible.
IP3	Inositol trifosfato.
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos.
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido.
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidado.
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato reducido.
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato oxidado.
NfκB	Factor Nuclear potenciador de las Cadenas Ligeras kappa de las células B activadas.
nNOS	Óxido Nítrico Sintetasa neuronal.
Nrf2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide -2.
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido.
OACM	Oclusión de la Arteria Cerebral Media.
ONOO-	Radical peroxinitrito.
PHs	Prolil-hidroxilasas.
PKA	Proteína Cinasa A.
PKC	Proteína Cinasa C.
PI3K	Proteína Cinasa 3-fosfoinositol.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa Reversa.
SOD-EC	Superóxido Dismutasa Extracelular.
UTR	Regiones no traducidas.

## II. RESUMEN

La isquemia cerebral es un evento que ocurre por la interrupción del flujo sanguíneo regional a causa de una reducción en la presión de perfusión, como ocurre en la hipotensión o por una obstrucción de vasos de pequeño o gran calibre. La reducción del flujo sanguíneo cerebral (FSC) altera la disponibilidad de glucosa y de oxígeno a las células del cerebro para mantener su metabolismo oxidativo normal, desencadenando varios eventos fisiopatológicos conocidos como cascada isquémica.

Varios trabajos de investigación se han enfocado en entender los mecanismos de respuesta celular y molecular que tienen las células del cerebro ante un evento de isquemia, principalmente en la expresión de genes que regulan respuestas adaptativas y de sobrevivencia. El sistema HO (enzimas antioxidantes) juega un papel importante en la protección y sobrevivencia celular por acción de los metabolitos producidos durante su catálisis enzimática. La HO-1 es la isoenzima más estudiada debido a su inducción por diversos estímulos. La HO-2 históricamente se ha considerado como una enzima constitutiva y su expresión alta en cerebro, participa en la protección ante estímulos de daño. Trabajos recientes de investigación han demostrado que la HO-2 tiene una respuesta diferencial a eventos de hipoxia en modelos *in vitro* e *in vivo*.

En este trabajo se evaluó la expresión de la HO-2 en tejido estriatal y corteza fronto-parietal utilizando el modelo de isquemia focal transitoria a través de la oclusión de la arteria cerebral media (OACM) en ratas. Los grupos que se trabajaron fueron: ratas control y ratas con 2 horas de isquemia y diferentes tiempos de recuperación de FSC o reperfusión (0, 2, 4, 6, 10, 24 y 48 horas). Se cuantificaron los niveles de ARNm de la HO-2 por PCR en tiempo real, niveles de proteína de la HO-2 por *western blot* y actividad enzimática del sistema HO. Se observó que la HO-2 a nivel de transcrito tuvo una respuesta diferencial estadísticamente significativa en ambos tejidos. En corteza se observó un incremento a 2 h de isquemia con 4 h de reperfusión y posteriormente un decremento a partir de 2 horas de isquemia con 6 h de reperfusión. A nivel de proteína, tuvo un aumento significativo a partir de 2 h de isquemia con 4 h de reperfusión



manteniéndose estos niveles hasta 2 h de isquemia con 10 h de reperfusión. Posteriormente se observó un decremento significativo en los tiempos de 2 h de isquemia con 24 y 48 h de reperfusión. En tejido estriatal, los niveles de transcrito en todos los tiempos mostraron una disminución en la expresión estadísticamente significativa con respecto al control. Este comportamiento también se observó a nivel de proteína. En la actividad enzimática del sistema HO, se observó un pico máximo a 2 h de isquemia con 6 horas de reperfusión en ambos tejidos. A pesar de que los niveles de proteína de la HO-1 muestran un incremento máximo a la 2 h de isquemia con 24 h de reperfusión, la actividad enzimática del sistema HO no se observa a ese tiempo. Esto es debido a que la expresión diferencial de la HO-2 interviene en la respuesta enzimática del sistema HO. Se ha sugerido que la HO-1 y HO-2 regulan su expresión para mantener la homeostasis del grupo hemo intracelular ante un evento de daño, ya que existen hemoproteínas que requieren de este grupo prostético para llevar a cabo respuestas celulares.

### III. INTRODUCCIÓN

#### 1. Fisiopatología de la Enfermedad Vascular Cerebral (EVC)

##### 1.1. Epidemiología

El concepto de EVC se refiere a cualquier trastorno en el cual un área del cerebro es afectada por un proceso patológico de uno o varios vasos sanguíneos cerebrales ocasionando una reducción del flujo sanguíneo (Robbins et al., 2005; Díez-Tejedor et al., 2001). Actualmente se considera como un grave problema de salud pública internacional, ya que constituye la tercera causa de muerte en países industrializados. Su incidencia mundial es de 1.5 a 4 casos por cada 1,000 habitantes (Margaiil et al., 2005; Candelario-Jalil E, 2008). En México, durante el periodo de 2000 a 2008 se reportó que en la población general (ambos géneros y cualquier edad), la EVC se colocó como la cuarta causa de muerte precedida de diabetes mellitus, enfermedad isquémica del corazón y enfermedades del hígado (figura 1).

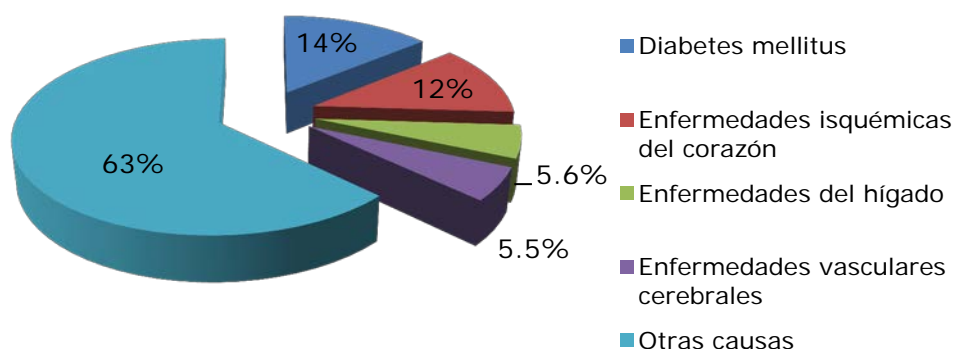


Figura 1. La EVC ocupa la cuarta causa de muerte en México, precedida de diabetes mellitus (1°), enfermedades isquémicas del corazón (2°), enfermedades del hígado (3°) (INEGI).

El número de defunciones atribuidas a la EVC, sin distinguir las formas agudas o crónicas, ni entre los distintos síndromes clínicos (principalmente infarto cerebral, hemorragia intracerebral, isquemia cerebral transitoria, hemorragia subaracnoidea y trombosis venosa cerebral) mostró un patrón de ascenso desde el año 2000 al 2008 (figura 2). Este ascenso se debió en parte a un mayor número de muertes en el grupo con edad de 15 a 64 años. En el grupo de personas mayor o igual a

65 años se observó un descenso en el número de muertes atribuidas a la EVC (SINAIS).

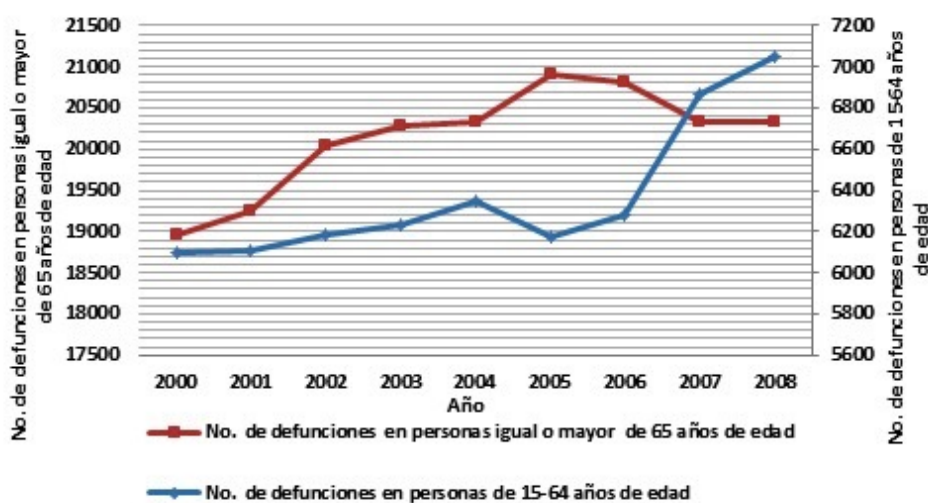


Figura 2. Número de defunciones atribuidas por la EVC desde 2000 a 2008 en personas entre 15 y 64 años y mayores de 65 años de edad. (SINAIS).

## 1.2. Clasificación de la EVC.

Desde el punto de vista fisiopatológico, la EVC se clasifican en:

➤ **EVC hemorrágica:** Se produce por la ruptura de un vaso sanguíneo, el cual puede ser dentro de los hemisferios cerebrales, tallo cerebral o cerebelo denominándose "intraparenquimatosa" o bien en el espacio subaracnoideo, es decir, sobre la superficie cerebral denominándose "subaracnoidea". La causa más frecuente de rotura de un vaso sanguíneo cerebral no traumático es la presencia de un aneurisma, término que se refiere a una dilatación permanente de una arteria ocasionada por la debilidad de su pared debida principalmente por hipertensión arterial. Representa el 15% de las causas de una EVC.

➤ **EVC isquémica:** Se produce por la disminución del aporte sanguíneo cerebral debido a una reducción en la presión de perfusión, como ocurre en la hipotensión o por una obstrucción de vasos de pequeño o gran calibre. Representa el 85% de las causas de una EVC. (Robbins et al., 2005; Díez-Tejedor et al., 2001).

Cuando disminuye el flujo sanguíneo en una parte del cerebro, la supervivencia del tejido en riesgo depende de diversos factores como:

- 1) Disponibilidad de la circulación colateral,
- 2) la duración de la isquemia, y
- 3) la intensidad y rapidez de disminución del flujo sanguíneo.

Estos factores van a determinar el tamaño preciso de la lesión y en consecuencia, el déficit clínico. La lesión isquémica aguda se clasifica en:

➤ **Isquemia cerebral global:** Se presenta cuando existe una disminución generalizada de la perfusión cerebral, debido a un ataque o paro cardíaco, shock, hipotensión sistémica severa o por obstrucción de las arterias principales que llevan el flujo sanguíneo al cerebro, como las arterias carótidas y vertebrales.

➤ **Isquemia cerebral focal:** Se produce por la disminución o interrupción del flujo sanguíneo en una zona cerebral localizada debido a una afectación de vasos sanguíneos cerebrales (Robbins et al., 2005).

En función de que el proceso isquémico focal se revierta o no antes de 24 horas, se clasifica en:

➤ **Accidente Isquémico Transitorio (AIT)**, que generalmente dura entre 2 y 15 min y con una duración inferior a 24 h, e

➤ **Infarto cerebral o Accidente Isquémico permanente (AIP):** se produce cuando la isquemia cerebral es lo suficientemente prolongada en el tiempo (superior a 24 h) (Díez-Tejedor et al., 2001; Lewandowski et al., 2008).

### **1.3 Etiología, factores de riesgo y sintomatología de la EVC isquémica.**

La disminución o interrupción del flujo sanguíneo a un área del cerebro se debe principalmente a 4 mecanismos: **1) trombosis cerebral**, la cual ocurre cuando un coágulo (trombo) obstruye una arteria cerebral bloqueando el flujo sanguíneo. El trombo puede formarse en una arteria afectada por la formación de una placa de ateroma o por invasión vascular por tumor, los cuales son iniciadores para la formación de una agregación

plaquetaria, formando coágulos que impiden la circulación sanguínea; **2) embolia cerebral**, el cual ocurre cuando una parte de un coágulo formado principalmente por cardiopatías, se desprende y es transportado por el torrente sanguíneo (émbolo) al cerebro, llegando a arterias más pequeñas donde ya no puede ir más lejos cortando el suministro de sangre; **3) hipoperfusión sistémica**, debida a una hipotensión severa o por síndrome de hiperviscosidad y **4) estrechamiento del vaso sanguíneo** por patología vascular inflamatoria o infeccioso. (Matthew & Joseph, 2009). El embolismo y la trombosis son las causas más frecuentes (Allen & Bayraktutan, 2008).

Existen múltiples factores de riesgo en isquemia cerebral y son clasificados en **1) modificables**: como la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus tipo 2, las cardiopatías, el consumo de tabaco, el alcoholismo, el sobrepeso y el sedentarismo; **2) no modificables**: como la edad, el sexo y la raza; y **3) genéticos**: como son las mutaciones de genes denominados como NOTCH3, HTRA1 y COL4A1, enzima convertidora de angiotensina y la protrombina entre otros, que se ha sugerido están relacionados con la susceptibilidad a sufrir un evento vascular (Margaill et al., 2005; Markus HS., 2011).

La isquemia es la principal causa de EVC en México, teniendo una prevalencia de un 72.94%. La arteria principalmente afectada en los pacientes es la arteria cerebral media (ACM). En la actualidad se sabe que la hipertensión arterial y diabetes mellitus tipo 2 son los dos factores de riesgo que más influyen en el desarrollo de la EVC (Cabrera-Rayó et al., 2008). El aporte de sangre al cerebro se consigue mediante las dos arterias carótidas y las dos arterias vertebrales que se unen formando el tronco basilar, que en la base del cráneo establecen una comunicación formando el polígono de Willis (figura 3). Los síntomas de una isquemia cerebral dependen del lugar en el que se produzca la disminución del flujo sanguíneo, así como de la intensidad y extensión de la isquemia.

Los principales síntomas (Matthew, & Joseph, 2009) que se presentan en un evento vascular son:

- Cefalea intensa y repentina
- Debilidad o parálisis del brazo, pierna o el rostro, generalmente de un lado del cuerpo.
- Incapacidad para caminar y/o ataxia (descoordinación en el movimiento de las partes del cuerpo).
- Vista nublada o amaurosis en uno o ambos ojos (pérdida de la visión que no está asociado con una lesión visible).
- Tinnitus (fenómeno perceptivo de sonidos en el oído, que no proceden de ninguna fuente externa) y/o hipoacusia (deficiencia auditiva).
- Disfagia (dificultad para comer) y/o afasia (pérdida de capacidad de producir o comprender el lenguaje).
- Mareo, confusión, desmayo y/o coma.

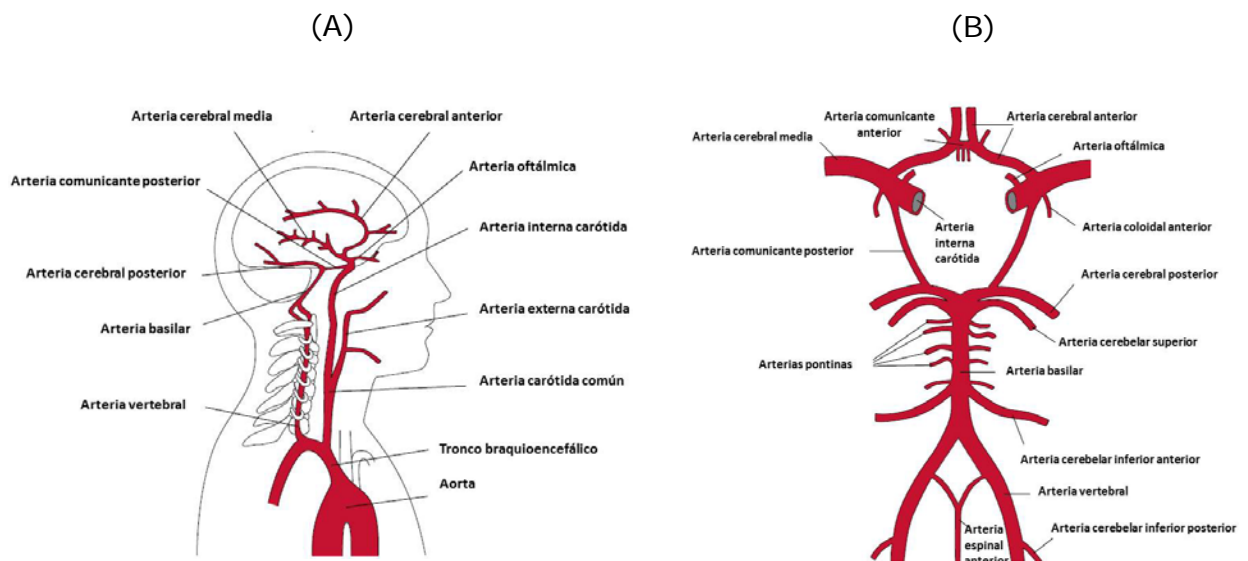


Figura 3. Irrigación sanguínea en el cerebro. A) Anatomía vascular cerebral. B) Polígono de Willis.

#### 1.4. Isquemia cerebral: zonas de infarto y penumbra.

El flujo sanguíneo cerebral (FSC), que normalmente es de 50 a 55 mL por minuto por 100 g de tejido, es un sistema autorregulado que debe proveer el adecuado y constante aporte de oxígeno, glucosa y otros nutrientes. Así mismo, debe favorecer la remoción de productos metabólicos

de desecho (Robbins et al., 2005; Sharp et al., 2004). El cerebro es capaz de consumir alrededor del 20% del total de oxígeno contenido en la sangre circulante. Por otro lado, una persona que pesa 70 kg, consume glucosa a una velocidad de 10 g / h aproximadamente, de los cuales alrededor de 6 g / h son absorbidos por el sistema nervioso central, y el resto lo consumen los demás tejidos (Mehta et al., 2007). Esto indica que las células neuronales y células gliales tienen una alta actividad metabólica (Juurlink & Sweeney, 1997).

Después de un evento de isquemia cerebral es posible observar dos regiones morfológicas de importancia fisiológica, debido a que la reducción del flujo sanguíneo no es homogénea en la zona isquémica (Dirnagl et al., 1999, Sharp et al., 2004) (figura 4). La primera región es denominada **núcleo isquémico**, donde el FSC disminuye hasta 10 ml por minuto por 100 g de tejido ( $\leq 20\%$  del FSC normal). El daño neuronal es irreversible debido a que la mayoría de los elementos celulares mueren por necrosis, ya que esta zona depende estrictamente de la irrigación sanguínea de la arteria afectada. La segunda región está localizada en la periferia del núcleo isquémico denominada **penumbra isquémica** que se caracteriza por una reducción de FSC de entre 10 a 25 mL por minuto por 100 g de tejido ( $\leq 50\%$  del FSC normal) (figura 4). Es una zona potencialmente viable, donde la integridad del tejido se preserva pero no su función, debido al flujo residual dependiente de la circulación colateral que existe en esta región. Puede ser rescatada de su conversión a núcleo isquémico a través de la terapia trombolítica cuyo objetivo es recuperar el FSC (figura 5) (Dirnagl et al., 1999; Fraser PA, 2011).

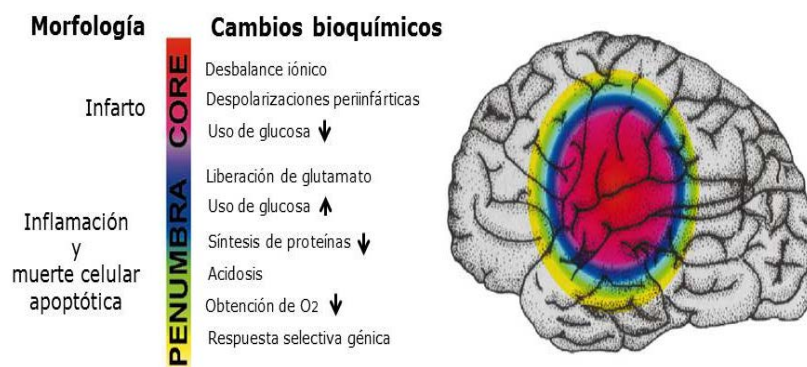


Figura 4. A) Zonas generadas en un daño Isquémico cerebral. Existe una región de infarto (núcleo) que se caracteriza por una muerte celular por necrosis y una región que preserva la viabilidad celular debido a un flujo residual dependiente de la circulación colateral (penumbra). Modificado de Dirnagl et al (1999).

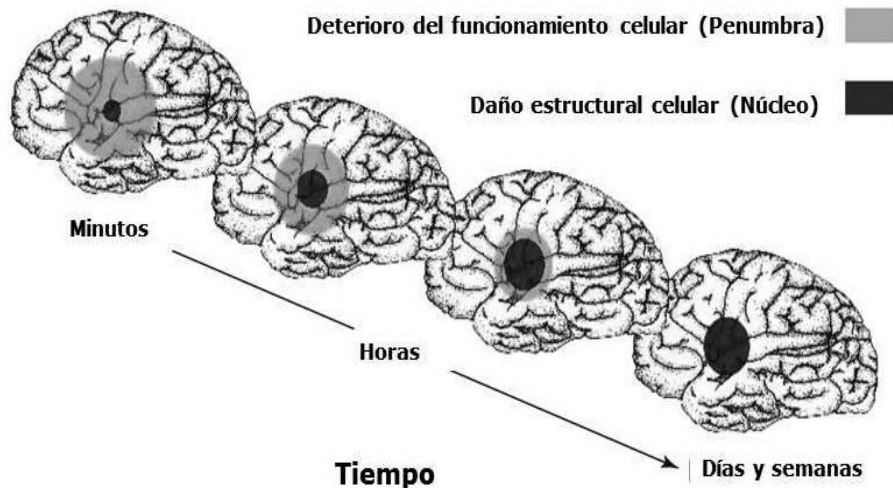


Figura 5. Eventos temporales en un proceso isquémico. Se muestra el área de penumbra que se caracteriza por una deficiencia funcional neurológica y la integridad estructural de la región en los primeros minutos. Mediante la intervención de terapias se puede recuperar el déficit funcional y clínico en los primeros minutos. Si esto no es posible el núcleo o la lesión estructural aumenta en función del tiempo provocando un daño irreversible. Modificado de Dirnagl et al (1999).

### 1.5. Aspectos Bioquímicos de la EVC isquémica

La reducción del FSC altera la disponibilidad normal de glucosa y de oxígeno a las células del encéfalo para mantener su metabolismo oxidativo normal, desencadenando varios eventos fisiopatológicos conocidos como cascada isquémica (Rodrigo et al., 2005; Durukan & Tatlisumak, 2007) entre los que se encuentran:

- 1) Interrupción de la producción de energía celular
- 2) Activación de la glucólisis anaerobia: acidosis láctica
- 3) Pérdida de los gradientes iónicos transmembranales
- 4) Incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}$ : edema citotóxico
- 5) Excitotoxicidad
- 6) Activación de enzimas dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$
- 7) Disfunción mitocondrial, estrés oxidativo celular y generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN).
- 8) Inflamación
- 9) Muerte celular



### **1.5.1 Interrupción de energía celular**

Ya que el encéfalo es uno de los tejidos que tiene un alto consumo de oxígeno y glucosa, la fosforilación oxidativa es su principal mecanismo metabólico para la producción de energía. La disminución del aporte de glucosa y oxígeno en el tejido conlleva una pérdida de producción de energía en forma de ATP (Dirnagl et al, 1999). Las células tanto neuronales como gliales, disminuyen el proceso de glucólisis aerobia y en respuesta activa el proceso de glucólisis anaerobia, provocando un aumento en la producción de ácido láctico y consecuentemente, un descenso del pH citoplasmático (acidosis) alterándose varios procesos dependientes de ATP.

### **1.5.2 Interrupción de las bombas de $\text{Na}^+/\text{K}^+$ y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ dependientes de ATP**

El impulso o señal nerviosa mediada por el potencial de acción, es un fenómeno provocado por la movilización de iones a través de la membrana citoplasmática celular. Los iones principales que intervienen en este proceso son:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ . Toda célula excitable como las neuronas, posee un potencial de membrana de reposo (-75mV), que es el resultado de la distribución desigual de los iones y cargas a través de la membrana celular. Este potencial negativo y homeostasis iónico se deben a las bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasas (Purves et al., 2007). Ante un evento isquémico, las fuentes de almacenamiento de ATP se ven rápidamente reducidas, los sistemas de transporte activo como las bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasas siguen funcionando por un cierto tiempo, contribuyendo a la depresión de las reservas de energía intracelular hasta que finalmente estas bombas pierden su función (Lee et al., 2000). La disfunción de estas bombas ocasiona un desequilibrio del gradiente iónico membranal, reflejado como un aumento de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , y  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular y un aumento de  $\text{K}^+$  extracelular, provocando un edema citotóxico, una lisis osmótica y finalmente una muerte celular por necrosis. Este tipo de muerte celular se produce principalmente en el núcleo isquémico y tiene la peculiaridad de activar el proceso inflamatorio, potenciando de esta manera el daño en el tejido. También ocurren despolarizaciones masivas concéntricas que desencadenan un proceso denominado excitotoxicidad mediada por el

neurotransmisor glutamato y por el ión  $\text{Ca}^{2+}$  (Phan et al., 2002). Las bombas de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  ATPasas de membrana plasmática y del retículo endoplásmico, tienen la función de mantener la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en condiciones fisiológicas. La falla de estas bombas debido al déficit de ATP sobre todo en retículo endoplásmico, considerado como un organelo celular de depósito de este ión, provoca un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Como se verá más adelante, el calcio juega un papel único en la fisiopatología isquémica, ya que causa varios eventos de daño celular (figura 7) (Mergenthaler et al., 2004).

### **1.5.3 Mecanismos de excitotoxicidad por Glutamato y efectos tóxicos del $\text{Ca}^{2+}$**

Las despolarizaciones perinfárticas debidas al desbalance iónico, denominadas como ondas de despolarización, constituyen un fenómeno que involucra una depresión transitoria del gradiente iónico en las células y está acompañada por un aumento negativo del potencial extracelular por arriba de 30 mV. Tiene la forma de una onda concéntrica que se mueve a partir del área de supresión eléctrica (núcleo isquémico) hacia la periferia (penumbra) durante la isquemia. El aumento en la frecuencia de estas ondas de despolarización aumenta los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la síntesis y liberación del neurotransmisor glutamato en las terminaciones sinápticas (Siesjö BK, 2008). El glutamato inicia el mecanismo de excitotoxicidad a través de la sobreactivación de los receptores ionotrópicos como son: R-NMDA1 y R-NMDA2, R-AMPA versión Flop, y R-KA1, R-KA2, y receptores metabotrópicos como Rm-Glut 1 a 8. La activación de los receptores ionotrópicos tiene como consecuencia el aumento de la permeabilidad de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Durukan & Tatlisumak, 2007; Szydłowska & Tymianski, 2010). Los receptores metabotrópicos de glutamato, principalmente Rm-Glu 1 y 5, son receptores acoplados a proteínas G que conducen la activación de la fosfolipasa C, produciendo IP3 (inositol trifosfato) y DAG (Diacilglicerol) por el desdoblamiento de fosfoinositol-bifosfato. El IP3 se une a receptores específicos del retículo endoplásmico favoreciendo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gerber et al., 2007).

El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, además de iniciar una lisis osmótica y una muerte por necrosis, funciona como segundo mensajero activando una serie de enzimas proteolíticas como la calpaína. De esta manera aumenta la degradación de ciertas proteínas como la actina y espectrina pertenecientes al citoesqueleto, entre otras. Activa también varias cinasas como la PKC, endonucleasas, lipasas (Fosfolipasa  $A_2$ , Fosfolipasa C, COX2) y la activación de la óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS), incrementando la degradación de ADN, potenciando el proceso de lipoperoxidación y aumentando la producción de ERO y ERN (figura 7) (Szydlowska & Tymianski, 2010).

Estos eventos tóxicos conducen a la muerte celular por apoptosis en la región de penumbra isquémica. Por tanto, las despolarizaciones perinfárticas, ocasionan que esta región de penumbra se convierta en núcleo isquémico (Dirgnal et al., 1999). Las células del sistema nervioso, presentan una jerarquía con susceptibilidad preferencial o vulnerabilidad selectiva. Las neuronas son las células más vulnerables a diferencia de las células gliales (Robbins et al., 2005).

#### **1.5.4 Producción de ERO, ERN y estrés oxidativo**

Los radicales libres son aquellas especies químicas, que tienen uno o más electrones desapareados en su última capa electrónica. Esta característica les proporciona una gran reactividad y pueden ser derivados de oxígeno (ERO) o de nitrógeno (ERN). La generación de radicales libres es un proceso fisiológico que tiene lugar en las células expuestas a un entorno aerobio. Los sistemas enzimáticos antioxidantes han evolucionado paralelamente al metabolismo aerobio para contrarrestar el daño oxidativo debido a estos radicales. A pesar de esta defensa antioxidante, el daño oxidativo sobre las proteínas, lípidos, glúcidos y al ADN, acumulado a lo largo de la vida, está en el origen de enfermedades neurodegenerativas y en muchos procesos patológicos (Halliwell B, 2006). Las ERO y las ERN se pueden clasificar como se describe en la tabla 1:

**Tabla 1. Clasificación de ERO y ERN**

Radicales libres	(No radicales)
ERO	ERO
Superóxido $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno $H_2O_2$
Hidroxilo $\cdot OH$	Peróxido orgánico $ROOH$
Hidroperoxilo $HO_2^{\cdot}$	Peroxinitrito $ONOO^{\cdot-}$
Peroxilo $RO_2^{\cdot}$	Peroxinitrato $O_2NOO^{\cdot-}$
Alcoxilo $RO^{\cdot}$	Ácido Peroxinitroso $ONOOH$
ERN	ERN
Óxido nítrico $NO^{\cdot}$	Ácido nitroso $HNO_2$
Dióxido de nitrógeno $NO_2^{\cdot}$	Catión nitrosilo $NO^+$
Nitrato $NO_3^{\cdot-}$	Anión nitroxilo $NO^{\cdot-}$
	Trióxido de Dinitrógeno $N_2O_3$
	Peroxinitrito $ONOO^{\cdot-}$
	Peroxinitrato $O_2NOO^{\cdot-}$
	Ácido Peroxinitroso $ONOOH$
	Catión Nitronio $NO_2^+$

El estrés oxidante se define como un desbalance fisiológico entre la producción de especies oxidantes y la función del sistema biológico antioxidante (enzimático y no enzimático), provocando un daño potencial al organismo (Lakhan et al., 2009). El cerebro y el sistema nervioso son propensos al estrés oxidativo y no cuentan con sistemas adecuados de defensa antioxidante para prevenir el daño oxidativo en curso y por el daño oxidativo adicional ocasionado por enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington y EVC (Halliwell B, 2006). Las células están constantemente expuestas a la producción endógena y exógena de ERO y ERN. Entre las fuentes exógenas se encuentran la radiación ultravioleta, medicamentos, solventes, anestésicos, hidrocarburos aromáticos y xenobióticos. La producción endógena es debida a la función mitocondrial a través de la cadena transportadora de electrones. La mitocondria es la principal fuente de ATP en las células aerobias. Sin embargo los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones son los principales generadores del  $O_2^{\cdot-}$ . Otras enzimas que producen ERO son la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la COX 1 y 2, la NOS y citocromo P450. La NADPH oxidasa es una enzima asociada a membrana de fagocitos y cataliza la reducción del oxígeno molecular produciendo el radical  $O_2^{\cdot-}$

utilizando NADH ó NADPH como donador de electrones (Babior BM, 2002). La xantina oxidasa cataliza la oxidación de substratos bien sean endógenos como las purinas o exógenos como el etanol. La principal función a nivel fisiológico es la oxidación de la hipoxantina y de la xantina a ácido úrico, produciendo  $H_2O_2$  (Granger DN, 1999). Las isoformas de las enzimas COX, COX1 (enzima constitutiva) y COX2 (enzima inducida por citocinas, factores de crecimiento y endotoxinas) actúan sobre el ácido araquidónico, formando PGG2 en PGH2. Es durante esta síntesis cuando se produce el radical superóxido, debido al componente peroxidasa. Las lipooxigenasas son enzimas que catalizan la oxigenación de ácidos polihédricos hasta originar los hidroxiperóxidos lipídicos a partir del ácido araquidónico. De igual forma que la COX, es durante esta síntesis cuando se generan ERO (Favreau et al., 2004). Las isoformas nNOS, eNOS e iNOS, son enzimas que catalizan la reacción de L-arginina a citrulina produciendo también el radical  $NO\cdot$ . En ciertas condiciones, son capaces de generar  $O_2^{\cdot-}$  (Cosentino et al., 1998). El radical  $NO\cdot$  reacciona con el  $O_2^{\cdot-}$  generando el  $ONOO^-$ , que es considerado como una de las especies potencialmente oxidantes.

A partir de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  se generan las diferentes ERO y ERN mediadas por enzimas, interacciones químicas o por catalizadores metálicos como el  $Fe^{2+}$  y el  $Cu^{2+}$  (Halliwell B, 2006). La generación no moderada de las ERO y ERN provocada por la sobreactivación de enzimas como las fosfolipasas, lipooxigenasas, COXs, NOS y xantina oxidasa activadas por el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular debido al proceso isquémico, provoca un daño oxidativo de proteínas, lípidos y ADN. El daño a proteínas por la acción de las ERO y ERN incluye peroxidación, daño a residuos de aminoácidos específicos, cambios conformacionales de la estructura terciaria, fragmentación y degradación. En el caso de las enzimas, se produce pérdida de la actividad enzimática, y pueden observarse alteraciones de las funciones celulares como la producción de energía en forma de ATP y la interferencia en la generación de los potenciales de membrana entre otros efectos nocivos. Entre los principales daños causados a las proteínas, se encuentran la formación de aductos entre el radical peroxinitrito y otro radical reactivo de nitrógeno con el residuo de tirosina, produciendo 3-nitrotirosina, un marcador de daño oxidante de proteínas (Kohen & Nyska, 2002). El daño al ADN por las ERO y ERN provoca mutaciones, alteraciones

en la estructura del ADN como desaminaciones de las bases púricas y pirimídicas y rupturas de las cadenas de ADN. El radical  $\cdot\text{OH}$  tiene una gran reactividad sobre el ADN ya que puede unirse a las bases nitrogenadas, formando aductos. Por otro lado, la guanidina es la base nitrogenada más susceptible al daño oxidante por el  $\cdot\text{OH}$  y el  $\text{ONOO}^-$ , ya que forma la 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiguanosina, un marcador del daño oxidante al ADN (Medeiros MH, 2008). El daño que ocasionan las ERO y ERN sobre los lípidos de las membranas biológicas genera diversos compuestos tóxicos y altera su fluidez y permeabilidad, modificando la actividad de proteínas, enzimas, receptores y canales iónicos asociados a las membranas, comprometiendo la estructura y función celular (figura 7) (Zenteno & Saldaña, 2008). Por otro lado, la sobreproducción de ERO y ERN provoca daño mitocondrial a través de la desestabilización de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, promoviendo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y varias proteínas pro-apoptóticas y el citocromo C, que tienen como función activar la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis (Li P, 1997).

#### **1.5.5 Muerte Celular.**

El proceso de muerte celular isquémica puede presentarse de dos modos: necrosis y apoptosis. La necrosis, se presenta en mayor grado en la región del núcleo isquémico, mientras que en la región de penumbra se presentan ambos tipos de muerte (figura 7) (Durukan & Tatlisumak, 2007).

La necrosis es la muerte patológica que se origina por una lesión aguda e irreversible que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas como la isquemia, hipoxia, traumatismo, exposición a radiación, acción de sustancias químicas entre otros. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática acompañada de una lisis celular, liberando al exterior todo el contenido citoplasmático. La liberación del contenido celular provoca a su vez reacciones inflamatorias, potenciando de esta manera el daño en el tejido debido a citocinas pro-inflamatorias que son necesarias para el reclutamiento de leucocitos en la zona de daño, con el objetivo de eliminar partículas que sean dañinas al organismo. Sin embargo estos leucocitos

potencian la activación de enzimas como son COX2 e iNOS, responsables de producir ERO y ERN (Eltzsching & Eckle, 2011).

La apoptosis es una muerte celular controlada, regulada, programada y dependiente de energía que conlleva la activación de mecanismos específicos que dictan que se produzca la muerte celular. La formación de cuerpos apoptóticos provoca que no exista una respuesta inflamatoria (Taoufik & Probert, 2008; Curtin & Cotter, 2003). La apoptosis se puede dividir en dos vías: la **vía intrínseca o mitocondrial** y la **vía extrínseca o mediada por receptores**. El mecanismo principal de apoptosis en un evento de isquemia es la vía intrínseca, debido a la disfunción mitocondrial por excitotoxicidad. El organelo mediador central es la mitocondria. En las etapas iniciales de la apoptosis intrínseca se produce la reducción del potencial de membrana mitocondrial asociado a un desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico y por lo tanto la reducción de la síntesis de ATP. La permeabilidad de la membrana mitocondrial está controlada por un poro conocido como el poro de transición de permeabilidad mitocondrial constituido por las proteínas ANT, VDAC y ciclofilina D, que mantiene la homeostasis de la matriz mitocondrial. Los procesos que se desencadenan en un evento de isquemia como la generación de ERO y ERN activan esta ruta de señalización apoptótica que está regulada por proteínas de la familia Bcl-2. Dentro de esta familia de proteínas Bcl-2 se encuentran proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-X y pro-apoptóticas como Bax, Bak y Bad. Cuando existe una sobreactivación de proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas se induce la formación de poros mitocondriales liberando al citoplasma diversas proteínas como el citocromo C, el AIF (Factor inductor de apoptosis), la proteína Smac/DIABLO (segundo activador derivado mitocondrial de caspasa/proteína de unión directa a las proteínas inhibitorias de apoptosis), entre otras. También se genera un flujo de  $Ca^{2+}$ , ATP intracelular y ERO (Adams & Cory, 2001; Datta et al., 1997). La liberación del citocromo C es un evento crítico ya que interacciona con la proteína citosólica Apaf-1 formando un complejo proteico y por acción del ATP se une con la procaspasa 9, formando el megacomplejo heptamérico conocido como apoptosoma. El apoptosoma activa las caspasas efectoras, como la caspasa 3, 6 y 7, los cuales tienen diversas funciones como la degradación de una serie de proteínas pertenecientes al citoesqueleto como la

laminina, actina, espectrina; inactiva el complejo ICAD/DFF45 que permite a la proteína CAD (carbamoil fostato sintasa) entrar en el núcleo fragmentando el ADN e inactiva a la PARP (Poli ADP-ribosa polimerasa, una enzima encargada de reparar el ADN). El complejo Smac/DIABLO interacciona con las IAPs (proteínas inhibitorias de apoptosis) neutralizándolas y conduciendo el proceso de apoptosis (Lorenzo, H. K, 1999). De forma general, estos eventos provocan una alteración estructural nuclear, una reducción de volumen celular y finalmente una citólisis formando cuerpos apoptóticos. La **vía extrínseca**, tiene su origen en la membrana celular a través de receptores de muerte. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor de TNF (Factor de necrosis tumoral). Este mecanismo, se activa durante la recuperación del flujo sanguíneo e inflamación después de un evento de isquemia, potenciando el daño en el tejido (Medema et al., 1998). La señal se inicia tras la unión de los correspondientes ligandos como citocinas pro-apoptóticas y pro-inflamatorias (FasL y TNF) a sus respectivos receptores de muerte (R-Fas, R-TNF1, R-TRAIL1.) La unión del ligando provoca la formación del complejo de señalización de muerte denominado DISC, activando las caspasas 8 y 10. La caspasa 8, a su vez dirige la ejecución de la apoptosis activando a las caspasas ejecutoras (Curtin & Cotter, 2003). Los factores que determinan si las células se dirigen a la muerte necrótica o apoptótica son la gravedad y la duración de la isquemia. También estos factores determinan si la zona de penumbra se convierte en núcleo isquémico.

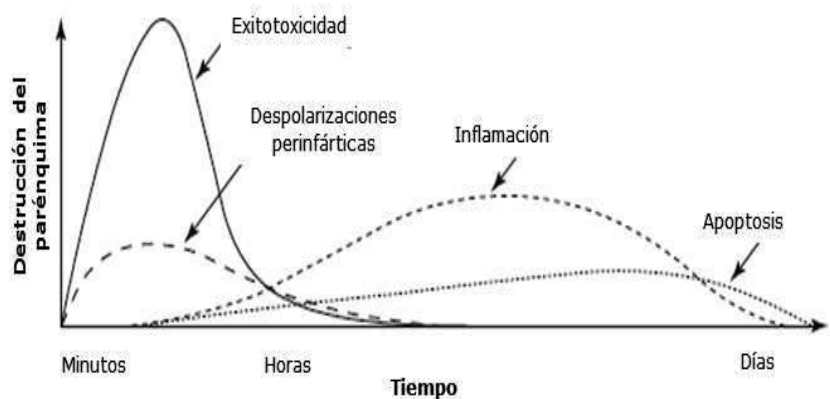
#### **1.5.6 Daño por reperfusión e inflamación**

El proceso de reperfusión se define como la recuperación del flujo sanguíneo después de que se ha presentado un proceso isquémico. Sin embargo, la reperfusión puede ser potencialmente dañina y actualmente se han descrito algunos mecanismos por los cuales incrementa el daño en el tejido isquémico (figura 7) (Lakhan et al., 2009). Durante el periodo de isquemia, disminuyen los niveles de expresión del complejo IV de la cadena transportadora de electrones, la Mn-SOD disminuye y existe una pérdida de la actividad de la citocromo oxidasa. Durante el periodo de reperfusión, existe una recuperación de O<sub>2</sub>, que al no ser metabolizado en el proceso de respiración celular por el deterioro de la maquinaria mitocondrial, aumenta



considerablemente la producción de ERO, exacerbando el daño en el tejido (Schaller & Graf, 2004). El daño producido durante la isquemia, genera una respuesta inflamatoria exógena que potencia el daño inicial (Emerich et al., 2002). El proceso inflamatorio empieza unas horas después del inicio de la isquemia y se caracteriza por un aumento en la expresión de genes pro-inflamatorios como citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas y moléculas de adhesión en el endotelio. Las citocinas inician y mantienen la respuesta inflamatoria a través de diferentes formas de acción a nivel autócrino, endócrino y parácrino, y por su capacidad para producir un número considerable de mediadores inflamatorios, incluidas otras citocinas y eicosanoides (Mergenthaler et al., 2004; Serracino et al., 2001). La IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$  son responsables de la señalización de migración de neutrófilos desde la sangre hacia el parénquima cerebral. Estas citocinas también manifiestan de manera local y sistémica la producción de proteínas de fase aguda, fiebre, caquexia (pérdida de peso), hipotensión y coagulación intravascular diseminada (Serracino et al., 2001, Tomai et al., 1999). Los neutrófilos inducen la producción de ERN y ERO a través de la sobreexpresión de la iNOS y COX2, incrementando la peroxidación lipídica y la consecuente desintegración de células, liberando y activando enzimas lisosomales (elastasas, colagenasas, proteasas, etc.). Las enzimas lisosomales degradan las proteínas locales y viajan por el torrente sanguíneo produciendo efectos dañinos en múltiples órganos. Este proceso de inflamación contribuye a la activación de la muerte apoptótica, potenciando de esta manera el daño en el tejido (figura 6) (Dirnagl et al., 1999; Mehta et al., 2007).

Figura 6. Evolución del daño en el parénquima de la cascada isquémica cerebral en función del tiempo. Modificado de Dirnagl et al (1999).



En el periodo de reperfusión se facilita la activación del proceso inflamatorio por la llegada de los neutrófilos y macrófagos en el área isquémica exacerbando el daño. La reperfusión no sólo produce daño en el órgano afectado, sino que al pasar el flujo sanguíneo por el tejido afectado transporta las ERO, ERN y componentes del proceso inflamatorio producidos durante la isquemia a todo el organismo, afectando distintos órganos lejanos como el pulmón, corazón, hígado, entre otros (Taoufik & Probert, 2008; Schaller & Graf, 2004). Durante la isquemia cerebral y la reperfusión, se activan una serie de mecanismos moleculares para la producción de proteasas denominadas como metaloproteinasas de matriz dependientes de zinc (gelatinasa-A, gelatinasa-B y estromelicina-1). La producción de ERO, ERN y las metaloproteinasas están involucradas en la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) a través de la degradación de las proteínas de unión provocando la pérdida de contacto entre astrocitos y células endoteliales (Mehta et al., 2007). La BHE está compuesta por la unidad neuro-glio-vascular que incluye células endoteliales, astrocitos, pericitos, neuronas y una matriz extracelular alrededor de los vasos. La BHE es responsable de la permeabilidad selectiva de moléculas del compartimento vascular hacia el cerebro a través de sistemas de transporte específicos y finamente regulados (Hawkins & Davis, 2005).

### **1.5.7 Mecanismos de adaptación y respuesta celular ante un evento de Isquemia-Reperfusión**

Además de las respuestas de daño bioquímico descritas anteriormente en un evento de isquemia-reperfusión, es importante resaltar que durante los primeros minutos de isquemia, las células desatan una respuesta de adaptación mediante un ajuste de la expresión génica con el fin de desencadenar una serie de señales como un proceso de protección y de recuperación o inhibir que la cascada isquémica se expanda en otras regiones del tejido (figura 7). La célula desata una respuesta para hacer frente a la hipoxia generada durante la isquemia a través de la expresión del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) (Aguilera et al., 2009). El HIF-1 es un complejo heterodimérico compuesto por dos subunidades denominadas como HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ . Bajo condiciones normales de oxígeno, el HIF-1 $\alpha$  está en constante degradación por la vía del proteosoma mediada por las

enzimas prolin-hidroxilasas (PHs). Bajo condiciones de hipoxia, la vía de degradación se inhibe, permitiendo que la subunidad HIF-1 $\alpha$  se establezca y se transloque al núcleo. Dentro del núcleo, se dimeriza con la subunidad HIF-1 $\beta$ , y junto con las proteínas CBP-p300, se une a las regiones de los elementos de respuesta a hipoxia (HRE), controlando a nivel transcripcional más de 70 genes que corresponden a proteínas relacionadas con la angiogénesis (VEGF, receptor FLT-1 del VEGF, Inhibidor-1 del activador de plasminógeno, TGF $\beta$ ); tono vascular (endotelina-1, receptores adrenérgicos  $\alpha_{1B}$ ); metabolismo de la glucosa (hexocinasa-1 y 2, lactato deshidrogenasa, transportadores de glucosa, gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa, enolasa-1); genes del suministro de oxígeno como la eritropoietina, genes de muerte celular como Bcl-2, BNIP3, y genes que codifican enzimas antioxidantes de fase 2 como la HO-1 (Ziello JE, 2007; Aguilera et al., 2009). Otro de los mecanismos de respuesta celular que combate el estrés oxidativo es a través de la activación del factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2). Es un factor de transcripción que regula la expresión de numerosos genes relacionados a enzimas detoxificantes y enzimas antioxidantes de fase 2. En condiciones normales, Nrf2 se mantiene en el citoplasma formando un complejo inactivo unido a un dímero de Keap1. Keap1 es una proteína citoplasmática que se encuentra unida a la actina que retiene a Nrf2 en el citoplasma. Dicha unión promueve la permanente degradación de Nrf2 por el proteosoma, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis de novo. Además de retener en el citoplasma a Nrf2, Keap1 sirve como sustrato adaptador para el complejo Culina 3/Rbx1–dependiente de E3 ubiquitín ligasa. Cuando Keap1 se une con Culina 3 promueve la ubiquitinación y la degradación de Nrf2 a través del proteosoma (Coople et al., 2008). La acción de las ERO, promueve la disociación de Nrf2 de Keap1, dirigiéndose al núcleo para dimerizarse con otras proteínas de la familia *bZIP* como Jun (c-Jun, jun-D y Jun-B) y proteínas Maf (MafG, MafK, MafF). De esta forma se une a los elementos de respuesta antioxidantes (ARE) induciendo la expresión de enzimas de fase 2 como son: glutamato cisteín ligasa, glutatión sintetasa, glutatión-S-transferasa, glutatión peroxidasa, NADPH quinona oxidoreductasa, hidrolasa epóxida microsomal, HO-1, ferritina, entre otros (Jaiswal AK, 2004). Otros

factores de transcripción que intervienen en la respuesta del estrés oxidativo son Nf-kB y AP-1. En condiciones fisiológicas, Nf-kB se encuentra en el citoplasma, asociado con una familia de moléculas inhibitorias llamadas IκBs. La fosforilación de IκB a través de la IKK conduce a la ubiquitinación y degradación de IκB por el proteosoma, permitiendo que Nf-kB se transloque al núcleo. Entre los genes diana de Nf-kB son: citocinas y quimiocinas (IL-1, IL-2, IL-10, IL-8, IL-17, TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ ); moléculas de adhesión celular (ICAM-1, P-selectina, VCAM-1); proteínas reguladoras de la apoptosis (Bcl-xL, Bcl-2, IAPs); factores de crecimiento (BDNF, VEGF); proteínas de respuesta al estrés (glutamato cisteín ligasa, Cu-SOD, Zn-SOD, NADPH quinona oxidoreductasa); entre otros. AP-1 es un factor de transcripción heterodimérico compuesto por proteínas pertenecientes a la familia de Fos y la familia de Jun. La fosforilación de las proteínas Jun por la JNK y Fos por la ERK, son señales de translocación al núcleo (figura 5). Una vez en el núcleo, se dimerizan y se unen al complejo proteico CBP-p300 para regular de manera transcripcional genes involucrados en la regulación de la apoptosis y respuesta al estrés oxidativo (TGF $\beta$ , Bcl-xL, glutatión-S-transferasa, HO-1, entre otros) (Kaminska et al, 2000; Siomek A., 2012).

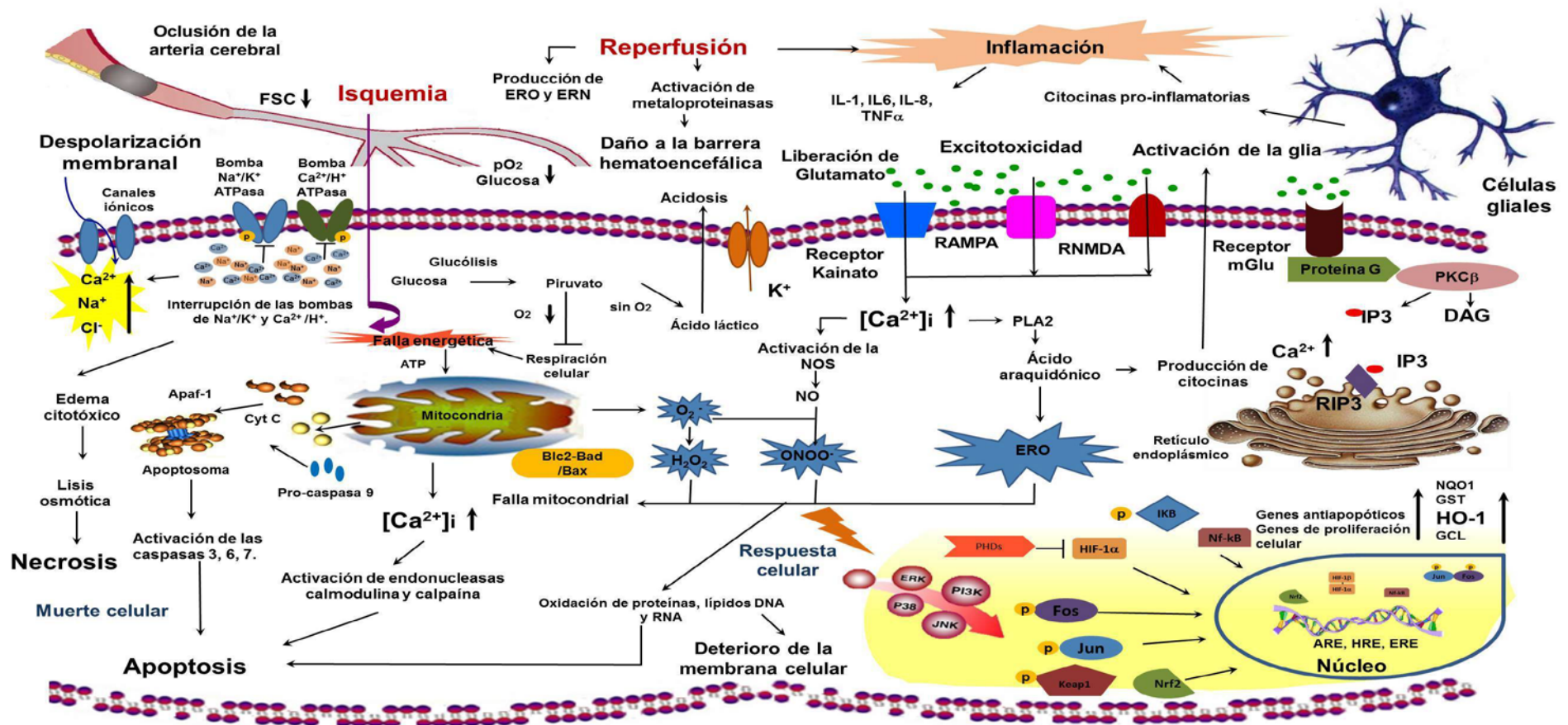


Figura 7. Mecanismos moleculares de daño y respuesta celular en un evento de isquemia-reperfusión. La cascada isquémica involucra: interrupción de la producción de energía celular, activación de la glucólisis anaerobia (acidosis láctica), pérdida de los gradientes iónicos transmembranales, incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (edema citotóxico), excitotoxicidad (despolarizaciones perinfárticas), activación de enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , disfunción mitocondrial (estrés oxidativo celular y generación de ERO y ERN), inflamación y muerte celular (necrosis en la región del núcleo isquémico y apoptosis en la región de la penumbra). Las células neuronales activan una respuesta celular ante un evento de isquemia a través de la activación de los factores de transcripción HIF-1 $\alpha$ , Nrf2, Nf-kB y Fos-Jun (AP-1).

## 2. Modelos de isquemia cerebral focal.

Un elemento crucial en el estudio de la fisiopatología de la isquemia cerebral es el uso de modelos en roedores. Presenta varias ventajas como su menor costo económico a diferencia de modelos *in vitro*, la facilidad de su manejo y de su monitorización fisiológica, así como su mayor aceptación ética (Ginsberg MD, 1996). Adicionalmente, la homología genética, así como las similitudes en la anatomía, fisiología y reactividad de la vasculatura cerebral entre roedores y humanos, apoyan también la elección de estos modelos (Mhairi MI, 1992).

Los distintos modelos animales utilizados para estudiar el accidente cerebral vascular (ACV), se agrupan en tres grupos: modelos de isquemia global, de isquemia focal y hemorrágica. Los modelos hemorrágicos se basan en la producción de un sangrado en el cerebro, siendo la infusión de colagenasa la principal forma de lograrlo. Los modelos de isquemia global, basados en la oclusión de las grandes arterias que irrigan el encéfalo, se usan cada vez menos debido a la opinión generalizada de que reproducen mejor las consecuencias cerebrales del fallo cardíaco que las de un accidente cerebrovascular (Green et al., 2003). Los modelos de isquemia focal están basados en la oclusión permanente o transitoria de una arteria cerebral específica. Generalmente se llevan a cabo ocluyendo la ACM, debido a que en humanos la mayor incidencia de infartos focales se localiza en las áreas irrigadas por ese vaso. De los pacientes que sufren una isquemia cerebral, el 80% se asocian con daño isquémico en ese territorio (McAuley MA, 1995).

Los principales métodos de oclusión arterial en roedores son: trombosis inducida fotoquímicamente, embolismo con un coágulo o con microesferas, coagulación o ligadura, oclusión intraluminal y, finalmente, el empleo de cepas de ratas espontáneamente hipertensas que desarrollan infartos de forma espontánea (Leciñana et al., 2001; Brinker et al., 1999). En determinados casos de isquemia cerebral, el FSC puede restablecerse, bien por disgregación espontánea del trombo, o bien por intervención quirúrgica, por lo que resultan de gran interés los modelos que permiten la inducción de isquemia focal reversible. Entre estos modelos de isquemia

focal transitoria, los más utilizados son la compresión arterial mediante pinzamiento o ligadura (Shigeno et al., 1985), la aplicación abluminal de endotelina 1 sobre la arteria (Macrae et al., 1993) y la oclusión intraluminal de la ACM.

## 2.1 Modelo de oclusión de la arteria cerebral media (OACM)

El modelo de OACM, permite llevar a cabo la oclusión proximal de la ACM de forma reversible y sin craneotomía, introduciendo un monofilamento dentro de la arteria carótida interna y haciéndola avanzar hasta el origen de la ACM bloqueando el flujo sanguíneo (figura 8) (Zea Longa et al., 1989). Para obtener volúmenes de infarto reproducibles, es requerido un tiempo mínimo de isquemia entre 60 a 90 minutos, razón por la cual, los modelos de isquemia focal transitoria usualmente utilizan 90 a 120 minutos de isquemia. El volumen del infarto dependerá fundamentalmente de la duración de la isquemia y de la severidad de la misma, así como de otros factores como son: temperatura corporal, presión arterial, glucemia, pH y presiones parciales de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en sangre (Leciñana et al., 2001). Aunque se conoce la influencia de estos parámetros hemodinámicos y metabólicos sobre el resultado de la isquemia, en la actualidad la mayoría de los estudios publicados sobre la neuroprotección son llevados a cabo sin tenerlos en cuenta.

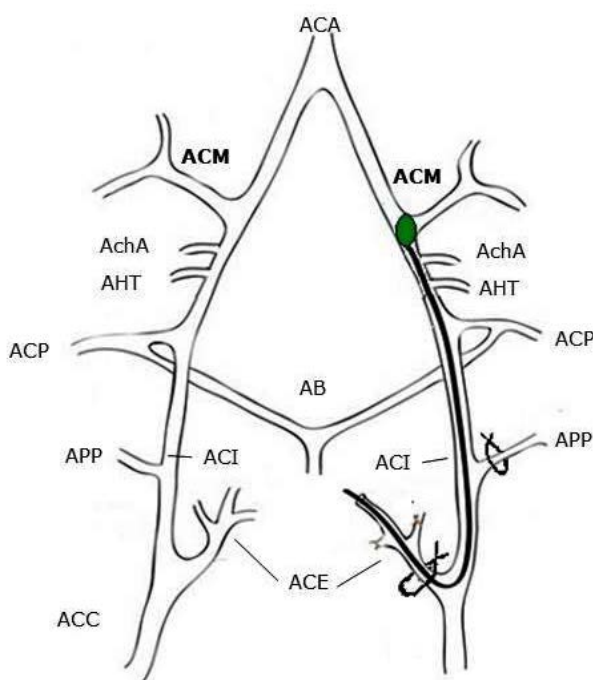


Figura 8. Técnica de sutura intraluminal de oclusión de la arteria cerebral media (Método de Longa). Inserción del monofilamento por la arteria carótida externa (ACE), siguiendo la arteria carótida interna (ACI), hasta ocluir la arteria cerebral media (ACM). ACA, arteria carótida anterior; AChA, arteria coroidea anterior; AHT, arteria hipotalámica ; ACP, arteria comunicante posterior; APP, arteria pterogopalatina; AB, arteria basilar ; ACC, arteria carótida común. Modificado de Uluç et al (2011).

### 3. El Sistema Hemoxigenasa (HO).

El sistema HO (EC 1.14.99.3, donador de hidrógeno-oxígeno oxidoreductasa) consiste en una familia de enzimas microsomales que participan en la regulación de los niveles de varias hemoproteínas a través de la degradación del grupo hemo, ejerciendo funciones en la regulación de algunos procesos fisiológicos, patofisiológicos y citoprotectores (Maines MD, 1997; Ryter & Tyrrell, 2000). La reacción que lleva a cabo la HO, se realiza a partir de la dimerización y función coordinada con el citocromo P450 NADPH reductasa transformando el grupo hemo a biliverdina (BV), produciendo monóxido de carbono (CO) y liberando  $Fe^{2+}$  (figura 9) (Mancusco & Barone, 2009). Los integrantes del sistema HO provienen de genes diferentes, *hmx1* y *hmx2*, que a nivel de proteína son denominados como hemoxigenasa-1 (HO-1) y hemoxigenasa-2 (HO-2). Se ha reportado una tercera isoenzima denominada como HO-3, pero estudios recientes indican que se trata de un pseudogen derivado de transcritos de la HO-2, ya que no se ha detectado que la secuencia reportada de la HO-3 codifique una proteína (Hayashi et al., 2004).

Ambas isoenzimas poseen un efecto protector ante diversos mecanismos de daño a través de la actividad biológica que tienen los metabolitos producidos durante la catálisis. La BV ha sido descrita como un antioxidante capaz de neutralizar ERO y ERN producidas por daño celular. El efecto antioxidante de la BV se potencia a través de la conversión a bilirrubina (BR) por acción de la biliverdina reductasa (BVR). La sobreproducción de CO y BR son productos potencialmente tóxicos (Mancuso & Barone, 2009), sin embargo en concentraciones bajas ejercen efectos protectores (Sass et al., 2003).

El CO tiene un papel importante en procesos de señalización intracelular actuando como un modulador vascular (vasodilatador), anti-inflamatorio, anti-proliferativo y anti-apoptótico. El  $Fe^{2+}$  liberado durante la catálisis, es removido rápidamente por la ferritina y la transferrina, evitando la capacidad pro-oxidante a través de las reacciones de Fenton (Otterbein et al., 2000).



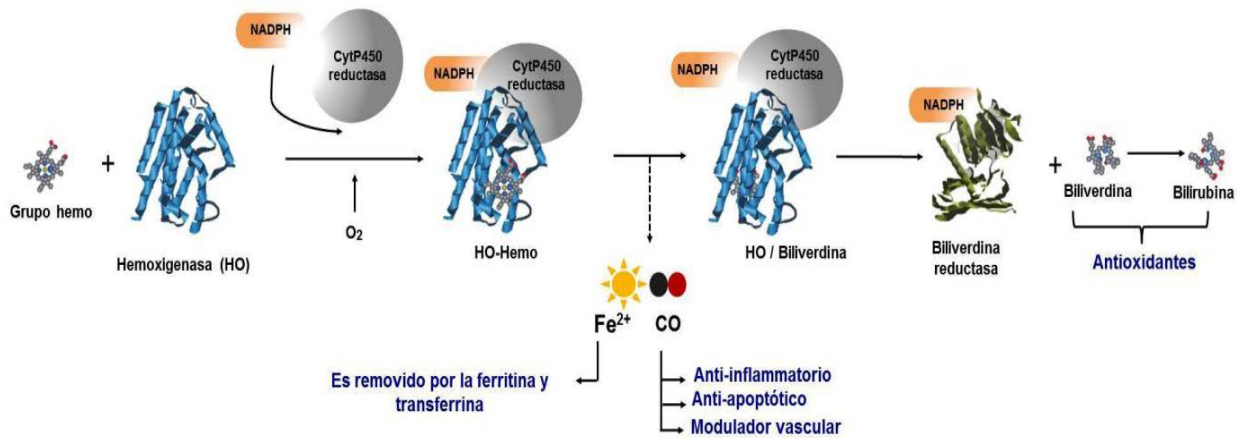


Figura 9. Reacción enzimática del sistema HO. Los metabolitos producidos durante la reacción catalítica poseen actividad biológica. La BV y BR son potentes antioxidantes, el CO actúa como un modulator vascular, anti-inflamatorio y anti-apoptótico, el  $Fe^{2+}$  libre es removido por la acción de la transferrina y ferritina evitando la formación de radicales  $\cdot OH$  a través de las reacciones Fenton.

A lo largo de la evolución, la HO-1 y HO-2 han conservado la secuencia primaria de aminoácidos y nucléotidos entre especies. La similitud para la HO-1 en humanos, ratones y rata es mayor al 80%; para la HO-2 en rata, conejo y humano es mayor al 90%. Sin embargo, la identidad de la secuencia de aminoácidos entre ambas isoformas decrece más del 43%. Solamente un segmento de 24 residuos de aminoácidos se ha conservado en ambas proteínas que para la HO-2 corresponde a los residuos 145-168 y para la HO-1 corresponde a los residuos 126-149 en humano. Este segmento de residuos conforma el sitio catalítico (Rotenberg & Maines, 1991). Dentro de este segmento, existe una sustitución conservativa de leucina encontrada en la HO-1 por una metionina localizada en la HO-2. En la secuencia de los 24 residuos se ha conservado la histidina 151 en HO-2 y 132 para la HO-1, que son importantes para facilitar la reacción catalítica (McCoubrey & Maines, 1993). Por otro lado los residuos de histidina 25 para la HO-1 y la histidina 45 para la HO-2 son esenciales para la estabilización del hierro del grupo hemo y llevar a cabo la reacción catalítica (Wilks et al., 1996). La figura 10 muestra la región conservada de ambas isoenzimas, teniendo una identidad del 55% y una similitud del 76%. A pesar de que la HO-1 y HO-2 catalizan la misma reacción, tienen propiedades bioquímicas, distribución tisular y regulación génica diferentes.

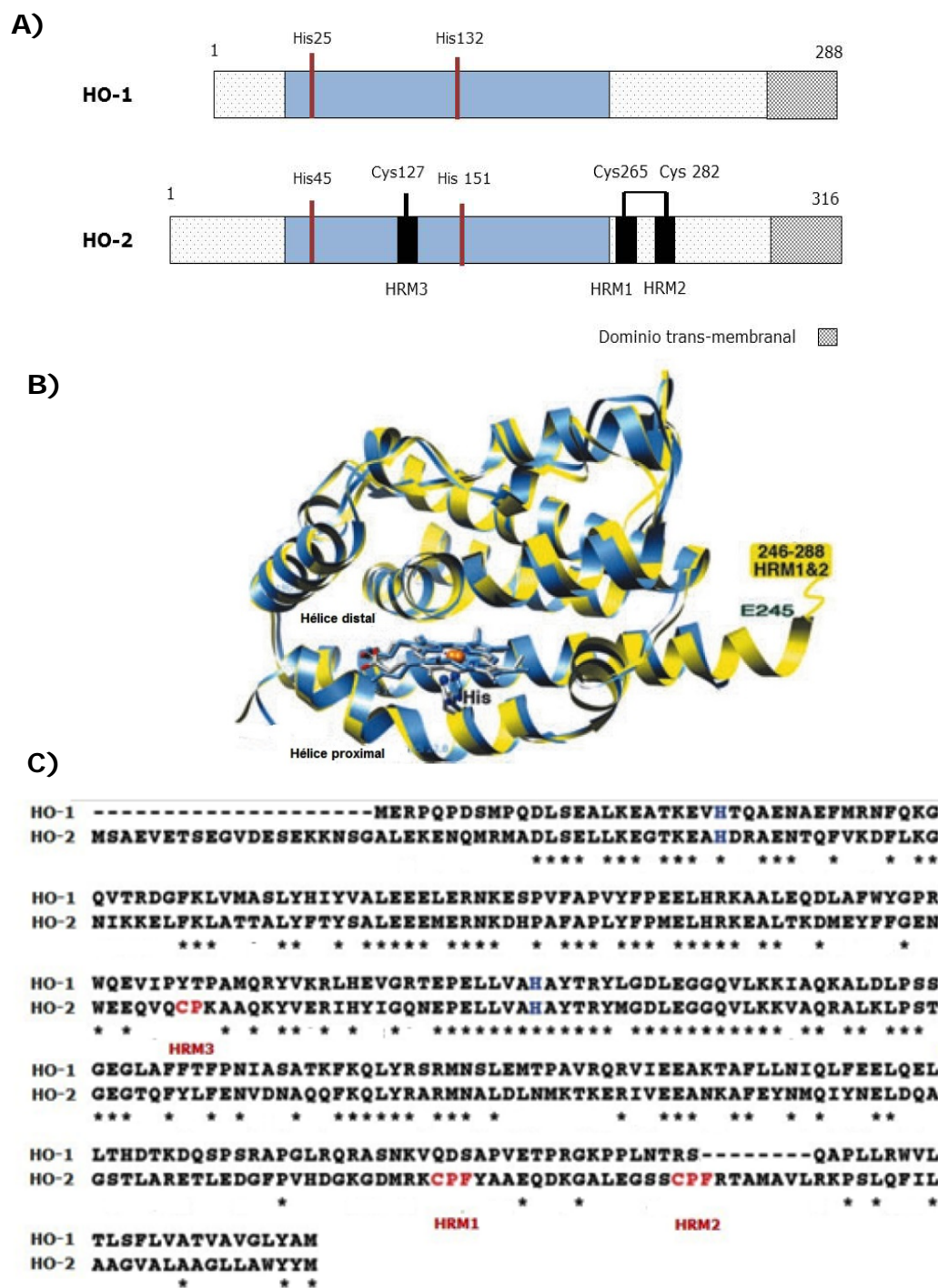


Figure 10. Comparación de la HO-1 y HO-2 a nivel de proteína. A) Organización de ambas isoformas, representando el área azul las regiones conservadas (identidad del 55% y una similitud del 76%). La HO-2 posee 3 HRMs, las histidinas 25 y 132 para la HO-1 y las histidinas 45 y 151, son esenciales para la reacción catalítica. B) Sobrelapamiento del centro catalítico, HO-1 azul y HO-2 amarillo. Tomado de Ragsdale & Yi 2011. C) Alineamiento de la estructura primaria de ambas isoenzimas. Los \* representan los residuos idénticos.

### 3.1 HO-1

La HO-1 fue la primera isoforma descrita en la degradación de los eritrocitos a través de la eliminación de los efectos tóxicos del grupo hemo (Maines MD, 2000). La HO-1 es producto de un sólo transcrito (1.8 kb) compuesto de 5 exones y 4 intrones. Pesa 32 kDa y pertenece a una familia de proteínas de choque térmico denominada Hsp32. Es la isoforma inducible, regulada por varias moléculas de señalización y factores de transcripción como son: Proteínas cinasas MAPKs (JNK, p38, ERK), PKC, PKA, PI3K/Akt, Nrf2, HIF-1 $\alpha$ , Nf $\kappa$ B, AP-1, AP-2, proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc, entre otros (Immenschuh & Ramadori, 2000, Alam & Cook, 2007). Muchas de las proteínas vinculadas a esta vía son miembros de la familia de factores de transcripción *bZip*. Otro miembro de la familia de proteínas *bZip* identificado recientemente es la BVR que actúa en la integración de la vía de señalización de insulina/IGF regulando la expresión de la HO-1 (Ahmad et al., 2002). La PI3k activada por la señalización de la insulina/IGF, interviene en la regulación de la HO-1 por medio de la activación y regulación de Nrf2. Otro factor de transcripción que interviene en la regulación de la HO-1 es Bach-1, que juega un papel importante como represor transcripcional (Shan et al., 2006). La HO-1 posee múltiples elementos reguladores en el promotor como son los ARE, elementos de respuesta antioxidante, elementos de respuesta a cAMP y HRE, que incrementan de manera considerable los niveles de la HO-1 en diversos estímulos como isquemia, hiperoxia, endotoxinas bacterianas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\beta$ -amiloide, ácido kaínico, dopamina, prostaglandinas, radiaciones ionizantes, citocinas inflamatorias, estrés oxidativo, metales pesados, entre otros (Dennerly PA, 2000; Schipper HM, 2000). La HO-1 es considerada actualmente como la enzima inducida por más estímulos. En humanos, se localiza la presencia de un polimorfismo satélite en el promotor del gen de HO-1 que regula la respuesta transcripcional en diferentes estímulos. Se ha observado que los individuos con un menor número de repeticiones (GT)<sub>n</sub> presentan una mayor expresión de HO-1 que los individuos con un mayor número de repeticiones (GT)<sub>n</sub>. Hay estudios que indican que los individuos con un menor número de repeticiones y por lo tanto una mayor expresión de HO-1 presentan menor susceptibilidad a presentar patologías,

principalmente cardiovasculares y renales por el papel protector que juega la HO-1 (Exner et al., 2004).

La HO-1 se expresa en bajos niveles en condiciones fisiológicas, excepto en bazo e hígado, en donde es abundante. En el cerebro, se ha encontrado en poblaciones neuronales del cerebelo, tálamo, hipotálamo, hipocampo y corteza cerebral en condiciones fisiológicas (Bergeron et al., 1998). Se han detectado niveles de expresión elevadas de la HO-1 en una variedad de condiciones patológicas como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, enfermedad de Alzheimer, asma, cáncer, ACV, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes, enfermedad gastrointestinal, daño pulmonar inducido por hipoxia, hipertensión, daño hipóxico-isquémico, nefritis, trasplante de órganos, daño de la médula espinal, entre otros (Wagener et al., 2003).

### **3.2 HO-2**

La HO-2 es la isoforma constitutiva, y su expresión se ha detectado predominantemente en cerebro, testículos, endotelio, hígado y la porción distal de la nefrona. Poco se sabe sobre los mecanismos de regulación de su expresión y función que tienen en condiciones fisiológicas y patofisiológicas. En la última década pocos grupos de investigadores se han dedicado a describir las características bioquímicas y el papel importante que desempeña en varios procesos fisiológicos. Varios autores han catalogado el gen de la HO-2 como un gen muy complejo, ya que se han identificado 5 transcritos diferentes en mamíferos en un rango de tamaño de 1.3 a 2.4 Kb (1.3, 1.7, 1.9, 2.1, 2.4 Kb). Estos transcritos comparten un número de 5 exones y 4 intrones. Las diferencias de los transcritos son debidas a *splicing* alternativo en la región 5' no traducida (UTR) cercano al exón 1 y en dos señales de poli-adenilación que están separadas por 560 nucleótidos. A pesar de los diferentes ARNm, todos codifican una sola proteína. Además, la cadena negativa del intrón 1 de la HO-2, contiene una secuencia de 1046 nucleótidos con un 87% de identidad a un ADNc que corresponde a la proteína HMG17 (*High Mobility Group Protein 17*), una proteína no histónica que se localiza en el núcleo y está implicada en la regulación de la estructura de la cromatina y la activación transcripcional de genes. Se ha

demostrado que entre las dos señales de poli-adenilación, forman estructuras secundarias (*stem/loops*) que proporcionan sitios de unión a proteínas que controlan la estabilidad del ARNm y control en la traducción (McCoubrey et al., 1995). La HO-2 es sensible a hipoxia y al estado redox de la célula, afectando la relación de los transcritos 1.3/1.9 Kb, siendo el transcrito de 1.3 Kb el que se traduce con mayor eficiencia (Sun et al., 1990). Así, el mecanismo para regular la actividad de la HO-2 es a través del control de los transcritos más que por la modulación de la expresión génica, dado que el único elemento de respuesta transcripcional descrito hasta el momento, es un sitio de unión a glucocorticoides (GRE), indicando que la expresión de la HO-2 es modulada transcripcionalmente por corticosteroides (Raju et al., 1997). Otro nivel de regulación de la actividad de la HO-2 es a nivel post-traducciona, mediante la fosforilación de la serina 79 por la caseína cinasa 2 (CK2). El proceso de fosforilación resulta por la activación y señalización de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina y la PKC (Boehning et al., 2003).

Otra diferencia entre la HO-1 y la HO-2 estriba en que esta última posee dos motivos reguladores del grupo hemo (HRM, por sus siglas en inglés "*Heme Response Motifs*"). Sólo ocho proteínas se han identificado que contienen estos HRM y son catalogadas como proteínas reguladoras de oxígeno y grupo hemo. Las proteínas son: Aminolevulinato sintasa 1 y 2, Bach-1, la proteína cinasa eIF2, Hap1, IRP2, IR, Per2 y finalmente la HO-2 (Ragsdale & Yi, 2011)

El HRM consiste de un núcleo dipeptídico conservado de cisteína-prolina flanqueado por un residuo básico en el N-terminal y un residuo hidrofóbico en el C-terminal. Son sitios de unión al grupo hemo que regulan la actividad y función de las proteínas relacionadas en los procesos de respiración y daño oxidativo, en la coordinación de la síntesis de proteínas y en el control de la disponibilidad del grupo hemo (Hon et al., 2000; Lee et al., 2003). Los sitios HRM de la HO-2 se localizan en los residuos de Cys<sup>265</sup> y Cys<sup>282</sup>. Los primeros estudios acerca de los HRM de la HO-2 sugerían que esta enzima además de degradar al grupo hemo, podría mantenerlo "secuestrado" a través de los HRM. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que no es un sitio de unión al grupo hemo *per se*. La función

de estos motivos es regular de manera indirecta la afinidad de la HO-2 por el grupo hemo a través de los cambios de óxido-reducción que sufren los residuos de cisteína de ambos HRMs, formando las formas reversibles tiol-disulfuro. En otras palabras, funcionan como interruptores para cambiar la afinidad por su sustrato dependiendo del estado redox en el que se encuentre (Yi & Ragsdale, 2007). Se ha reportado que el valor de  $K_d$  para el complejo HO-2-hemo cuando las cisteínas de los HRM1 y 2 están en un estado reducido (ditiol) es de 350 nM. El valor de  $K_d$  cambia a 33 nM cuando los HRMs están en su forma oxidada (disulfuro), indicando que la afinidad incrementa cuando la HO-2 está en un estado oxidado (figura 11) (Yi et al., 2009).

Una función clave de la HO-2 está vinculada en los estados redox y el metabolismo de CO, el cual modula la actividad de los canales  $BK_{Ca}$ . Los primeros estudios que determinaron la relación que tiene la HO-2 y el canal  $BK_{Ca}$  fue trabajando con el cuerpo carotídeo, el cual es un órgano secretor, ubicado a nivel de la bifurcación de la arteria carótida común y actúa como quimiorreceptor de la sangre. Es responsable de la detección de oxígeno y la respuesta hipóxica (Tang et al., 2003; Cui et al., 2009). Durante la hipoxia, los canales  $BK_{Ca}$  sobre la membrana de las células del cuerpo carotídeo están inhibidos, permitiendo la despolarización por el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular. La activación de estos canales, permite una repolarización de la membrana. Resultados recientes indican que la modulación de la actividad de los canales  $BK_{Ca}$  está dada a través de los interruptores redox, mediada por la formación tiol/disulfuro en los dominios HBD de los canales  $BK_{Ca}$ . La HO-2 es responsable de la actividad de los canales  $BK_{Ca}$  por medio de la disponibilidad del grupo hemo y la producción de CO para controlar la actividad de estos canales. Bajo condiciones normóxicas, los dominios HRM de la HO-2 y HBD de los canales  $BK_{Ca}$ , están en un estado oxidado, donde la HO-2 tiene alta afinidad por el grupo hemo y los canales  $BK_{Ca}$  tienen baja afinidad por el grupo hemo. Por lo tanto, los canales  $BK_{Ca}$  se abren por la disociación del grupo hemo o por acción del CO generado a través de la catálisis de la HO-2. En condiciones de hipoxia, los bajos niveles de  $O_2$  permiten que la HO-2 pierda su afinidad por el grupo hemo por acción de los HRMs permitiendo que el hemo se una a los HBD de los canales  $BK_{Ca}$  o por la baja producción de CO, resultando un cierre de los canales  $BK_{Ca}$ . En

otras palabras, la HO-2 funciona como un sensor de  $O_2$  a través de la regulación de los canales  $BK_{Ca}$  (figura 12) (Cui et al., 2009; Yi & Ragsdale, 2007).

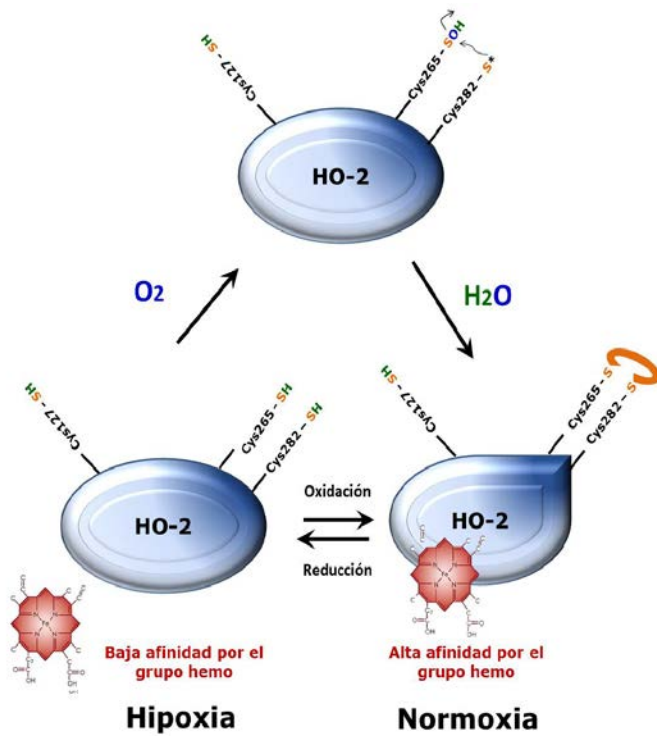
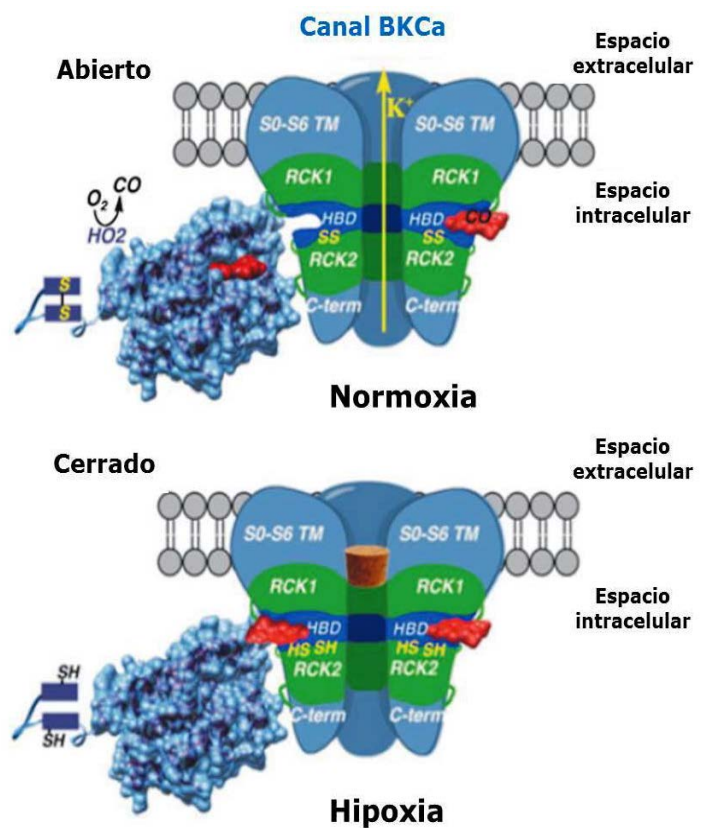


Figura 11. Regulación de la afinidad de la HO-2 por el grupo hemo a través de los HRMs. Conversión de tiol a disulfuro de los HRM 1 y 2 involucrando un intermediario sulfonato. El estado oxidado (formación de disulfuro), tiene mayor afinidad por el grupo hemo que el estado reducido (formación de tioles).

Figura 12. Modelo de regulación por óxido-reducción de la HO-2 y la actividad de los canales  $BK_{Ca}$ . En condiciones normales de oxígeno, la actividad de la HO-2 permite la apertura de los canales  $BK_{Ca}$  a través de la disponibilidad del grupo hemo y la producción de CO, mientras que en condiciones de hipoxia, la afinidad de la HO-2 por el grupo hemo disminuye, permitiendo el cierre de los canales  $BK_{Ca}$ . Modificado de Ragsdale & Yi, 2011.



### 3.3 El grupo hemo y su reacción de degradación catalizada por el sistema HO.

Varias enzimas requieren del grupo hemo como grupo prostético para llevar a cabo su reacción catalítica de tipo óxido-reducción como son: la catalasa que cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ; NOS la cual es la responsable de la síntesis de óxido nítrico a partir del átomo terminal de nitrógeno de la L-arginina; COX, encargada de producir prostaglandinas a partir del ácido araquidónico; NADPH oxidasa que cataliza la reacción de oxidación del NADH o NADPH a  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ , y algunos citocromos P450 (Kumar & Bandyopadhyay, 2005). Sin embargo, altas concentraciones del grupo hemo causan daño tisular y celular cuando éste es liberado de las hemoproteínas. El extremo hidrofóbico del hemo libre se intercala a la membrana celular incrementando la susceptibilidad de sufrir daño membranar. Una vez que el hemo está en la membrana celular, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido a partir de fuentes tales como los leucocitos activados, rompe el anillo tetrapirrólico del hemo liberando el  $\text{Fe}^{2+}$  que amplifica catalíticamente la producción de ERO en el interior de la célula a partir de la reacción de Fenton, desencadenando procesos de daño como la lipoperoxidación y oxidación de proteínas (Belcher et al., 2010). Por lo tanto el sistema HO es importante en la regulación de los mecanismos de daño que tiene el grupo hemo.

La reacción comienza con la formación del complejo HO- $\text{Fe}^{3+}$ hemo, la donación de dos electrones proveniente de NADPH mediada por la citocromo P450 NADPH reductasa y la unión de  $\text{O}_2$ , produciendo un intermediario hidroperóxido ( $\text{Fe}^{3+}$ -OOH). Posteriormente este intermediario, ataca el carbono meso  $\alpha$  de la porfirina para formar  $\alpha$ -meso  $\text{Fe}^{3+}$ -hidroxihemo. Esta especie, reacciona con otro mol de  $\text{O}_2$  y con la adición de un electrón, permite la descarboxilación en forma de CO del carbono  $\alpha$  y la formación del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -verdohemo. La siguiente reacción es la formación del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -biliverdina IXa por medio de la reacción con un mol de  $\text{O}_2$  y tres electrones. Finalmente, la adición de un electrón a este complejo permite la liberación del  $\text{Fe}^{2+}$  y la formación de la biliverdina IXa. Para la formación de la Bilirrubina por acción de la BVR, únicamente intervienen 2 electrones (figura 13) (Kikuchi et al., 2005).



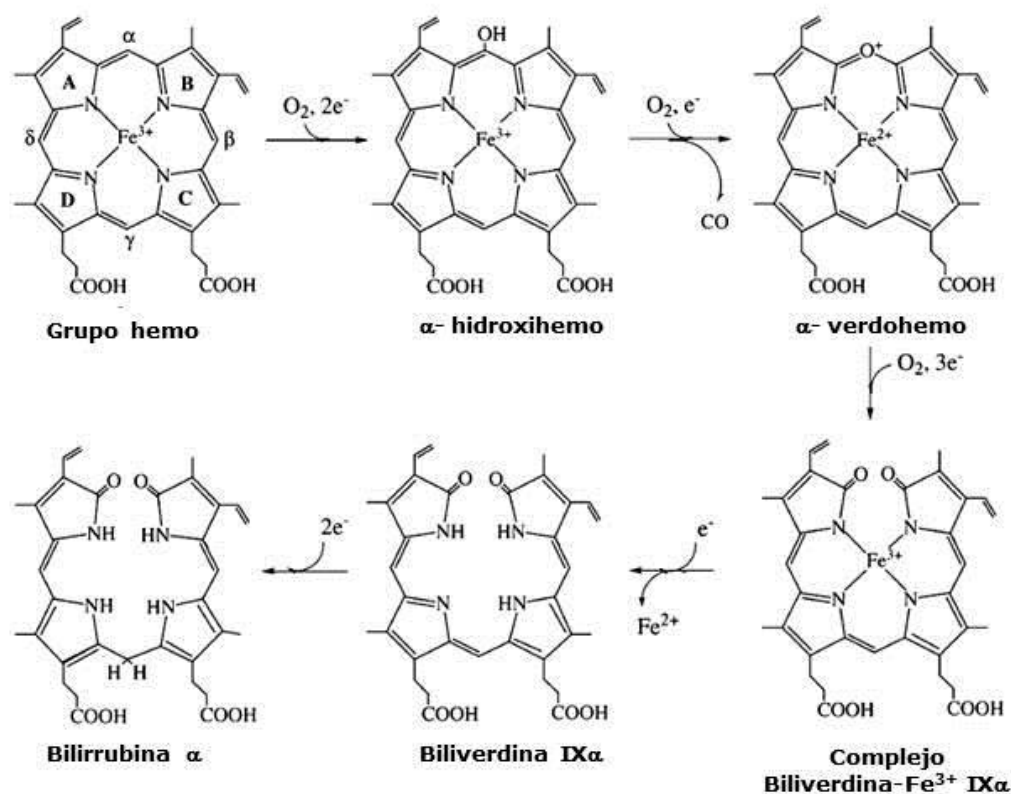


Figura 13. Mecanismo de degradación del grupo hemo. La conversión del grupo hemo a biliverdina IX $\alpha$  es catalizado por el sistema HO y la biotransformación de la biliverdina IX $\alpha$  a bilirrubina es catalizado por la Biliverdín reductasa. A, B, C representan los anillos pirrólicos del grupo hemo y  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  representan las posiciones de los carbonos del grupo hemo. Modificado de Kikuchi et al (2005).

### 3.4 Metabolitos del sistema HO

#### 3.4.1 Biliverdina y Bilirrubina

La BV y la BR son pigmentos biliares que se han considerado durante décadas como metabolitos tóxicos, particularmente en el sistema nervioso central. Recientemente, se ha demostrado que son moléculas con alto poder reductor que funcionan como potentes moléculas antioxidantes (Vitek & Schwertner, 2007). Incluso se ha demostrado que la BR es 30 veces más potente en la prevención de la oxidación de lípidos comparado con análogos de la vitamina E (Wu et al., 1994). Estudios *in vitro* con cultivo neuronal de rata han demostrado que una concentración de 10 nM de BR protege a las células contra concentraciones 10,000 veces más altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este efecto se ha explicado por un mecanismo en el cual la oxidación de la BR por las ERO resulta en la formación de la BV que es reciclada por la BVR para dar de nuevo la formación de la BR. Este mecanismo de reciclaje entre la BR y BV explica los potentes efectos antioxidantes de ambas moléculas

(Baranano et al., 2002; Sedlak & Snyder, 2004). Por otro lado se ha observado que ambas moléculas actúan como anti-inflamatorios, inhibiendo citocinas pro-inflamatorias y aumentando los niveles de citocinas anti-inflamatorias a través de la activación del factor de transcripción NFκB (Haga et al., 1996).

### **3.4.2 CO**

Desde hace mucho tiempo, el CO ha sido considerado como un gas tóxico, el cual interrumpe el transporte de oxígeno de la hemoglobina. Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que el CO juega un papel en la regulación de varios procesos fisiológicos. Distintos estudios han revelado que el CO interviene en varios procesos de señalización intracelular, culminando efectos como modulador vascular (vasodilatador), anti-inflamatorio, anti-proliferativo y anti-apoptótico. El CO se une directamente a proteínas como la Guanilato ciclasa (GC), proteínas de la familia citocromo p450, citocromo c oxidasa, NADPH oxidasa y la NOS modificando su actividad y función. En el caso de la GC, el CO tiene el efecto de incrementar la producción de GMPc permitiendo la vasodilatación, regulación del proceso de la neurotransmisión, inhibición de la agregación de plaquetas, y efectos anti-proliferativos en el músculo liso. La unión del CO a la NADPH oxidasa, inhibe su actividad reduciendo la producción de ERO. La función sobre la NOS es inhibir su actividad para reducir la producción de NO y por lo tanto la producción de ONOO<sup>-</sup>. En relación a los mecanismos anti-inflamatorios, se ha observado que el CO modifica la vía de señalización de MAPK-p38, que son responsables en la regulación de citocinas pro-y anti-inflamatorias (Roberts et al., 2004; Brouard et al., 2000; Otterbein et al., 2000).

Recientemente se ha demostrado que el CO, incrementa la estabilidad del factor de transcripción HIF-1α en macrófagos, permitiendo una protección de un daño de isquemia-reperfusión. El CO, promueve la síntesis de HIF-1α a través de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y MEK/ERK estabilizando la proteína HIF-1α por medio de la activación de la proteína Hsp9, la cual protege el HIF-1α de la ubiquitinación independiente de las PHs y por lo tanto de la degradación (Isaacs et al., 2002).

### 3.4.3 El Fe<sup>2+</sup>

El hierro es un cofactor esencial de numerosas proteínas celulares y cumple funciones biológicas importantes como son el transporte de oxígeno, transferencia de electrones en enzimas óxido-reductasas, en el metabolismo de la neurotransmisión y la síntesis de ADN. Sin embargo uno de los efectos tóxicos de su producción en exceso es la generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el radical ·OH a través de las reacciones Haber-Weiss y Fenton. La liberación del Fe<sup>2+</sup> por acción del sistema HO, promueve el incremento de la ferritina, una proteína "atrapadora de Fe<sup>2+</sup>" reduciendo los efectos tóxicos de éste (Schipper HM, 2004). Actualmente se ha observado en estudios con sulfato de hierro en un modelo *in vitro*, que el hierro incrementa la viabilidad celular ante un daño inducido por NO. Dentro de estos estudios, se ha observado la formación endógena de complejos de sulfuro-Fe<sup>+2</sup> que tienen la capacidad de atrapar el óxido nítrico, formando DNIC (*dinitrosyl iron-sulfur complex*). De esta manera el hierro tiene mecanismos de protección ante los efectos tóxicos del NO (Kim et al., 2000).

Con base en los antecedentes que se tienen registrados acerca de las funciones importantes que posee el sistema HO y en particular la HO-2, este proyecto se enfocó a determinar los cambios de expresión de la HO-2 y el papel que juega en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media (OACM) en rata.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado a través de un gran número de reportes la importancia del sistema HO en condiciones fisiológicas y patofisiológicas, ejerciendo efectos protectores por medio de la actividad biológica de los metabolitos que produce. Actualmente la HO-1 es la isoenzima más estudiada debido a su inducción por diversos estímulos como la hiperoxia, isquemia, endotoxinas bacterianas, radiaciones ionizantes, citocinas inflamatorias, estrés oxidativo, metales pesados, entre otros; y por acción de moléculas antioxidantes como la familia de los flavonoides y estatinas a través de la regulación de la vía Nrf2. La HO-2 por otro lado, ha sido considerada históricamente como una isoforma constitutiva. Desempeña un papel importante en el tejido nervioso por tener niveles de expresión altos a diferencia de la HO-1, por lo que se convierte en la fuente primaria de defensa contra ERO y ERN en este tejido. Estudios con animales HO-2<sup>-/-</sup> han revelado el papel protector de esta enzima. A diferencia de la HO-1, la HO-2 tiene un menor número de reportes de investigación, los cuales se han enfocado en las diversas funciones bioquímicas y mecanismos de regulación. Existen evidencias por ejemplo, de que su actividad es inducida por la vitamina K3, sin que exista un incremento de transcritos y cantidad de proteína, dado que el único elemento de respuesta transcripcional es un sitio de unión a glucocorticoides. Varios grupos de investigadores han demostrado que esta isoforma tiene una respuesta diferencial en su expresión en modelos de hipoxia e hipoxia-isquémica tanto *in vitro* como *in vivo*. Actualmente han catalogado como un gen complejo al gen de la HO-2, ya que posee varios mecanismos de regulación post-transcripcionales y post-traduccionales, aunque no se sabe de qué manera. Estas evidencias conducen a la idea de que la HO-2 no es estrictamente constitutiva y puede tener respuestas en su expresión por estímulos como la isquemia-reperusión.

## **V. HIPÓTESIS**

Si el sistema HO tiene una respuesta diferencial en su expresión tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* de hipoxia e hipoxia-isquémica, es probable que encontremos cambios en la expresión de la HO-2 como respuesta a un modelo de isquemia cerebral, por medio de la oclusión de la ACM.

## **VI. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la respuesta de la Hemoxigenasa-2 en un proceso isquémico a través de un modelo focal transitorio por oclusión de la ACM en ratas.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar los cambios en la expresión relativa del ARNm de la HO-2 utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real en corteza y estriado sometidos a 2 horas de isquemia focal transitoria y 0, 4, 6, 10, 24, 48 horas de reperfusión utilizando el modelo de la OACM en rata.
- Determinar la expresión de la HO-2 por medio de la técnica de *western-blot* en corteza y tejido estriado sometidos a 2 horas de isquemia focal transitoria y 0, 4, 6, 10, 24, 48 horas de reperfusión utilizando el modelo de la OACM en rata.
- Determinar la actividad enzimática del sistema HO en corteza y tejido estriado sometidos a 2 horas de isquemia focal transitoria y 0, 4, 6, 10, 24 y 48 horas de reperfusión utilizando el modelo de la OACM en rata.

## **VII. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Animales**

Se utilizaron ratas macho cepa *Wistar* en un rango de peso de 280 a 320 g, proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Los animales se mantuvieron en alimentación *ad libitum* y con ciclos de luz/oscuridad por 12 horas.

### **2. Oclusión de la ACM**

Los procedimientos experimentales estuvieron apegados a los lineamientos del Comité de Ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Los animales fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico para inducir el daño cerebral siguiendo la técnica propuesta por Longa et al., 1989, a través de la oclusión transitoria de la ACM. Los animales fueron anestesiados en una cámara con isofluorano al 2.5% con 20% de O<sub>2</sub> y 80% de N<sub>2</sub>. Posteriormente fueron sometidos a una incisión longitudinal de 1 cm en la región supraesternal en dirección cefálica para exponer la arteria carótida interna, externa y común. Se cauterizaron y cortaron las arterias occipital, tiroideas y pterigopalatina. A continuación, se realizó tracción con una seda en la región distal del nacimiento de la arteria carótida externa, se cauterizó y cortó por arriba de la seda. De igual forma se realizó tracción a la región de nacimiento de la arteria carótida externa, omitiendo la cauterización. Por debajo de la sutura se colocó un clip y se realizó una microincisión en la arteria carótida externa en el espacio comprendido entre las dos suturas por donde se introdujo un filamento de nylon de 30 mm de longitud para llegar a la carótida interna y finalmente bloquear el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media izquierda, dando inicio al periodo de isquemia.

### **3. Diseño experimental**

El tiempo de isquemia fue de 2 h. Al finalizar el periodo de isquemia, los animales se anestesiaron de nuevo para retirar el filamento, dando inicio a la reperusión.

Se asignaron los siguientes grupos:

- 1) Ratas control (CT).
- 2) Ratas con 2 h de isquemia sin reperfusión (2I/OR).
- 3) Ratas con 2 h de isquemia y tiempos de reperfusión de 2, 4, 6, 10, 24, 48 h (2I/2R, 2I/4R, 2I/6R, 2I/10R, 2I/24R, 2I/48R).

#### 4. Determinación del Déficit neurológico

La determinación del déficit neurológico se basó en tres pruebas sobre la coordinación motora:

- **Flexión de la pata contralateral a la lesión:** Para esta prueba, los animales fueron sujetos de la cola manteniéndolos suspendidos en el aire durante 10 segundos para observar la flexión de la extremidad trasera contralateral a la lesión. Las ratas control extienden ambas patas delanteras, mientras que las ratas con un daño isquémico flexionan la pata contralateral a la lesión.
- **Giros contralaterales:** Los animales fueron sujetos de la cola con una inclinación aproximadamente de 45°, de tal manera que las extremidades delanteras tocaran la superficie. Se observó el comportamiento de las ratas y se contó el número de giros en un tiempo de 30 segundos. Las ratas control tienden a caminar hacia enfrente, mientras que las ratas lesionadas por isquemia dan al menos 5 giros contralaterales a la lesión durante 30 segundos.
- **Movilidad espontánea:** Los animales fueron colocados en una superficie plana y se observó la conducta de exploración y desplazamiento durante 10 segundos. Las ratas control tienden a moverse y a desplazarse al momento de colocarlas en la superficie. Las ratas con daño isquémico severo no presentan o presentan muy poco esta conducta.

A cada prueba se le asignó un valor de 0 si el comportamiento fue normal y un valor de 1 si presentó conducta alterada. Aquellos animales que tuvieron un puntaje de 1 para las tres pruebas de déficit neurológico fueron sometidos al estudio. Se sacrificaron los animales por decapitación

minimizando su sufrimiento. Se extrajo la corteza fronto-parietal y el tejido estriatal del hemisferio izquierdo, para las posteriores determinaciones.

Se evaluó la conducta 15 minutos antes del periodo de reperfusión. La evaluación de la conducta tuvo como finalidad el determinar si hubo daño ocasionado por la isquemia y descartar aquellos animales que no fueron sometidos a la cirugía adecuadamente.

## **5. Niveles de expresión génica por RT-PCR en tiempo real.**

### **5.1 Aislamiento de ARN total.**

Para el aislamiento de ARN total proveniente de corteza y tejido estriatal, se utilizó 1 mL de TRIZOL®. Las muestras fueron homogenizadas durante 30 segundos. Se adicionaron 0.2 mL de cloroformo, se agitaron los tubos vigorosamente en un vortex y se centrifugaron a 12000 xg por 15 minutos a 4°C. De las tres fases formadas, se recuperó la fase acuosa donde se encuentra el ARN. Se procedió a la precipitación del ARN colocando 0.5 mL de isopropanol frío, se agitaron los tubos vigorosamente en un vortex y se centrifugaron a 12000 xg por 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 75%. Se agitó en vortex y se centrifugó a 9000 xg por 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet blanco formado durante 5 minutos a temperatura ambiente, se resuspendió en agua libre de nucleasas. Se cuantificó y se verificó por espectrofotometría el grado de pureza mediante la relación de absorbencia (260nm/280nm).

### **5.2 Síntesis de ADNc**

Se utilizaron 5 ug de ARN total para sintetizar el ADNc, usando hexámeros azarosos (50 ng) y desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs, 500 uM) con la transcriptasa reversa (200 U) en un termociclador a 37°C durante 1 h. El ADNc se utilizó para amplificar el gen de la HO-2 y el gen ARN ribosomal 18S como gen constitutivo.



### 5.3 Diseño de oligos de HO-2.

Se diseñaron un par de oligonucleótidos para el ADNc de la HO-2 de rata tomando en cuenta los diferentes transcritos de HO-2 en mamíferos que se ha reportado (McCoubrey et al., 1995). Los oligonucleótidos fueron diseñados entre el exón 2 y 3 como se muestra en el siguiente esquema:

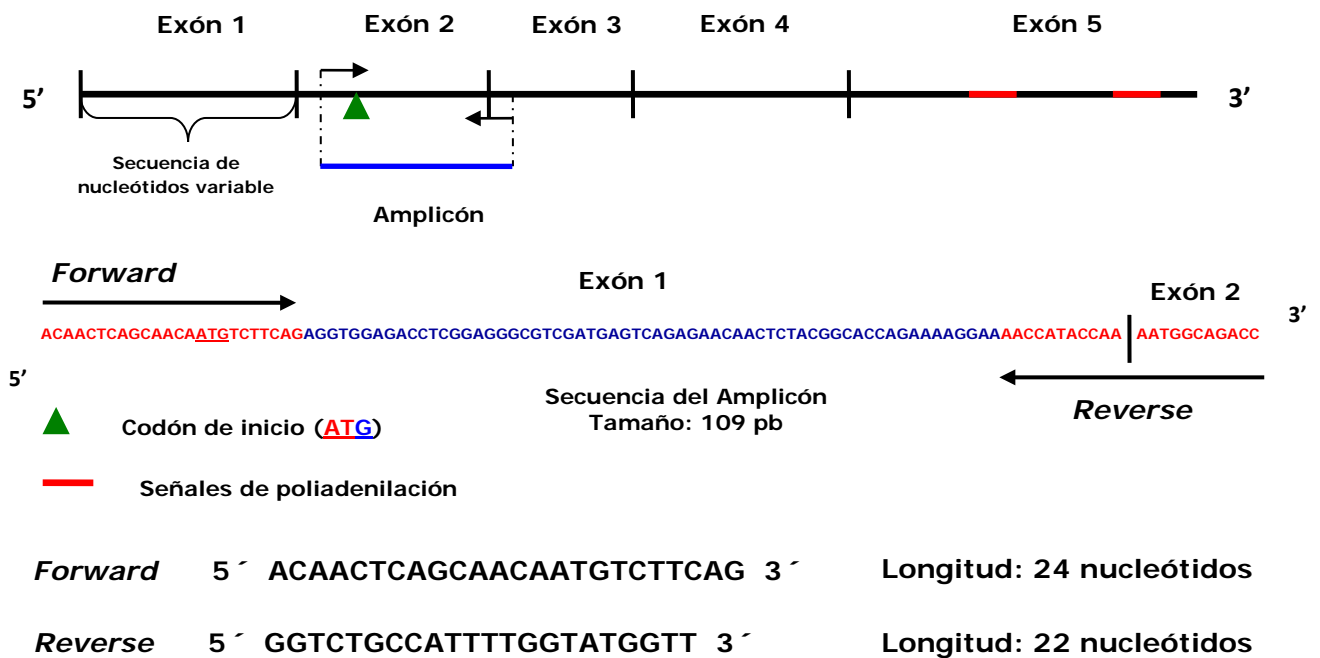


Figura 14. Mapa del diseño del amplicón del ADNc de la HO-2 en rata.

Para el diseño de los oligonucleótidos, se tomaron en cuenta los siguientes puntos:

- ✓ La región de amplificación se determinó entre el exón 2 y exón 3 de la HO-2 después de realizar un alineamiento de secuencias de nucleótidos entre el gen de la HO-1 y HO-2 utilizando como herramienta BLAST-n: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, ya que son genes homólogos.
- ✓ Se diseñaron de forma que la secuencia del *primer Reverse* está contenido entre los exones 2 y 3 y el *primer Forward* únicamente está contenido en el exón 2.
- ✓ El contenido de GC de los *primers* fue de 41.7% para el *forward* y 45.5% para el *reverse*.
- ✓ Se evitaron secuencias de 4 o más Gs continuas.

- ✓ Con respecto a la temperatura de alineación de *primers* ( $T_m$ ), se recomienda que ésta tenga un valor de 55-60°C. Los *primers forward* y *reverse* tuvieron una  $T_m$  de 55.8 °C en ambos oligonucleótidos. (calculado por la herramienta de OligoAnalyzer 3.1 de la página web <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>).
- ✓ Se evitó que los últimos nucleótidos del extremo 3' no tuvieran más de 2 Gs y/o Cs, para evitar la formación de dímeros de *primer*. Se realizó una comparación de la secuencia de los *primers* contra todo el genoma de la especie *Rattus norvegicus* para comprobar que sólo amplifica una secuencia única dirigida para la HO-2, utilizando la herramienta *primer BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).
- ✓ Se analizaron las posibles interacciones entre los *primers* y se evitó la formación de estructuras secundarias como los "*hairpins*" con  $T_m$  mayores a 40 °C y los dímeros de *primers* (*Self-dimer* y *hetero-dimer*) con energías de Gibbs de formación menor a -7 kcal/mol, utilizando la herramienta de OligoAnalyzer 3.1.

#### **5.4 Ensayo de amplificación preliminar para la HO-2 en PCR de punto final.**

La amplificación de HO-2 utilizando los oligonucleótidos diseñados se verificó con una PCR de punto final. Las condiciones de reacción (concentraciones finales) fueron: oligonucleótidos 2ng/uL, dNTPs 100mM, MgCl<sub>2</sub> 25mM, Taq polimerasa 0.5U/uL, y 1 uL de ADNc proveniente de la muestra control de corteza fronto-parietal, en un volumen de reacción de 50 uL. Las condiciones de temperatura de reacción fueron 2 min a 95°C de desnaturalización inicial: 35 ciclos de 45 seg a 95°C, 45 seg a 56°C para la alineación de oligonucleótidos, 72°C por 45 seg para la polimerización y 10 min a 72°C para la polimerización final. El producto se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

#### **5.5 Curva de disociación del amplicón de la HO-2.**

Se realizó una amplificación de PCR en tiempo real del gen de la HO-2 utilizando los oligonucleótidos diseñados utilizando como sonda el fluorocromo *SYBR Green* (*Mix TaqSybergreen* de *Applied Biosystem*), oligonucleótidos 2ng/uL, 1uL de cDNA de la muestra control de corteza

fronto-parietal. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador de PCR en tiempo real 7500 (*Applied Biosystems*) con las condiciones de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min y 40 ciclos a 95°C por 15 seg y 60°C por 1 minuto. Finalmente se realizó una curva de disociación.

## **5.6 Análisis de expresión génica por PCR en tiempo real.**

Antes de iniciar la evaluación de los cambios de la expresión génica de la HO-2, se realizó la validación del método de PCR en tiempo real por el método comparativo  $\Delta C_t$ . Las condiciones fueron: oligonucleótidos 2ng/uL, *Master Mix TaqSybergreen 1X*, y diferentes diluciones de ADNc (1, 1:10, 1:50, 1:500, 1:1000, 1:10000) en un volumen de reacción de 25 uL, con las condiciones de temperatura de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, y 40 ciclos a 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min.

Posteriormente se llevó a cabo el análisis de la expresión génica de la HO-2, utilizando las mismas condiciones de la validación del método. La dilución de ADNc que se utilizó fue de 1. Todas las muestras evaluadas se hicieron por triplicado y tuvieron una n=10.

## **6. Preparación de microsomas**

La corteza fronto-parietal y el tejido estriatal se homogenizaron de manera independiente en 1 mL de amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1M pH 7.4 en frío. Se sonicó por 15 seg a una potencia de 130 W utilizando un sonicador (VCX130PB-Sonicador 130 W) para lisar las células. El homogenado se centrifugó a 3,000 xg a 4°C por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 20,000 x g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos de ultracentrífuga, y se centrifugaron a 105000 xg en un rotor TLA 120.2, radio=31.8mm a 4°C por 50 minutos. Se decantó el sobrenadante y el pellet microsomal resultante se resuspendió por sonicación en un volumen de 300 uL de amortiguador de fosfatos  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1M/ $\text{MgCl}_2$  2 mM pH 7.4. Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry. A partir de esta suspensión, se realizaron los ensayos de actividad enzimática del sistema HO y Western blot para la HO-2.

## **7. Niveles de expresión proteica por *western blot*.**

Las fracciones microsomales de cada uno de los tejidos se utilizaron para cuantificar la expresión de la HO-2 normalizando con el gen constitutivo  $\alpha$ -tubulina. Se cargaron 40  $\mu$ g de proteína en un gel desnaturante de poliacrilamida al 12% por el método de Laemmli (acrilamida 30% / N,N metilenbisacrilamida 0.8%, Tris-HCl 1.5M/SDS 0.4% pH 8.8, PSA 10% y TEMED 0.07%). Se realizó la transferencia en una membrana de PVDF a 0.5 miliamperios durante 1.5 h en una cámara de transferencia fría.

Las membranas transferidas se bloquearon con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador de TBS-T (Tris-base 100 mM, NaCl 500 mM, 0.1% *Tween* pH 7.5) durante 3 horas. La membrana se incubó con el anticuerpo anti HO-2 (*Stressgen*) a una dilución 1:1000 preparado con el amortiguador TBS-T a 4°C por 24 horas. Se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno con el amortiguador TBS-T y posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (IgG-HRP) (*Jackson Laboratory*) por 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno con el amortiguador TBS-T y se reveló por quimioluminiscencia de alta sensibilidad utilizando placas de ultradiagnóstico.

La  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control de carga. Se ocuparon las mismas condiciones de incubación, lavado y revelado que para la HO-2, con una dilución 1:5,000 de anticuerpo primario anti  $\alpha$ -tubulina (*SIGMA*) y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (IgG-HRP) a una dilución 1:10,000 (*Jackson Laboratory*).

La expresión proteica de la HO-2 se cuantificó mediante el software Image J, haciendo una relación HO-2/ $\alpha$ -tubulina.

## **8. Actividad enzimática del sistema HO**

La actividad enzimática del sistema HO se determinó a través de un ensayo acoplado a la actividad de la BVR, mediante la cuantificación de

bilirrubina por espectrofotometría. Se utilizaron 150 ug de proteína en 175 uL de amortiguador  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1M/ $\text{MgCl}_2$  2mM pH 7.4.

### Preparación de blancos

Los blancos se prepararon para cada tejido (corteza fronto-parietal y tejido estriatal) de las muestras control. Se incubaron durante 10 minutos en baño María con agua en ebullición para desnaturalizar las proteínas.

### Preparación de mezcla de reacción

La mezcla de reacción se preparó de acuerdo a la tabla 2.

Se preparó una mezcla de reacción al momento de los ensayos. En la siguiente tabla se muestra cada uno de los reactivos y su respectiva concentración por cada reacción

**Tabla 2. Mezcla de reacción para la actividad enzimática del sistema HO**

Reactivo	Concentración final por reacción	Volumen por reacción
Citosol de hígado de ratón	---	25 uL
Hemina 2mM	100uM	2.5 uL
Glucosa 6 fosfato 20mM	5mM	12.5 uL
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa 800U/mL	4U/mL	0.25 uL
$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M/ $\text{MgCl}_2$ 2mM pH 7.4.	---	9.75 uL
Volumen total	---	50 uL

### Ensayo de actividad

Por cada reacción se adicionaron 50 uL de la mezcla de reacción a los 150 ug de proteína total. La reacción comenzó al adicionar 25 uL de  $\beta$ -NADPH 8mM. Las muestras fueron incubadas por 90 minutos a 37 °C en baño María. Después de este tiempo, la reacción se detuvo adicionando 0.5 mL de cloroformo y agitando por 20 segundos vigorosamente en el vortex y manteniendo a las muestras protegidas de la luz. Las muestras se

centrifugaron a temperatura ambiente por 1 minuto a 2,000 rpm, para separar las dos fases líquidas formadas (orgánica y acuosa). Se separó la fase orgánica con la ayuda de una micropipeta. Se realizó un barrido de 400 nm a 550 nm para ajustar a cero. Posteriormente se procedió a las lecturas de los blancos de cada uno de los tejidos y las muestras de manera intercalada.

La actividad enzimática se obtuvo a partir de los cambios de densidad óptica ( $\Delta OD$ ) del blanco y de las muestras, utilizando el coeficiente de extinción  $40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para la bilirrubina a 464 nm mediante la siguiente ecuación:

$$(OD_{464} - OD_{530}) = \Delta OD$$

$$\frac{(\Delta OD_{\text{muestra}} - \Delta OD_{\text{blanco}})}{40 \times (\text{mg proteína en la reacción})} \times \frac{1}{2} \div (\text{incubación en horas}) \times 10^6 = \frac{\text{pmol de BR}}{\text{mg proteína} \times \text{h}}$$

## VIII. RESULTADOS

### 1. Amplificación preliminar para la HO-2 en PCR de punto final.

La amplificación preliminar utilizando los oligonucleótidos diseñados para la HO-2 (ver material y métodos pag. 44) a través de la PCR de punto final tuvo como finalidad verificar el tamaño del producto del amplicón (109 pb). En la figura 15 se observa sólo una banda correspondiente al amplicón de la HO-2.

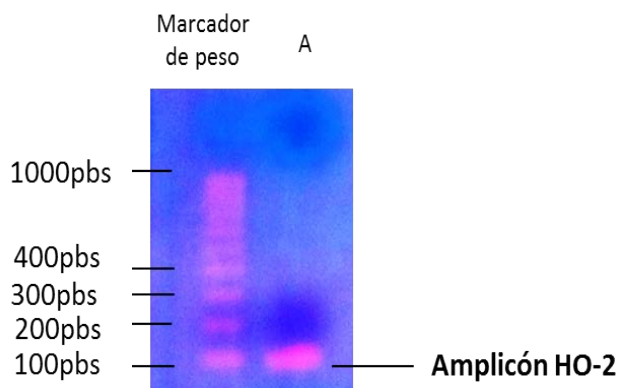


Figura 15. PCR de punto final. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5% que muestra la banda del amplicón de 109 pb de la HO-2 utilizando los oligos diseñados

### 2. Curva de disociación

El sistema de detección para la determinación de la expresión génica de la HO-2 fue el uso del fluorocromo *SYBR green*, por lo tanto se realizó una curva de disociación para verificar que la amplificación de la HO-2 corresponde a un producto específico (figura 16). El resultado del gráfico muestra un solo pico que representa un producto de ADN producido en la reacción de amplificación, teniendo una temperatura de disociación ( $T_m$ ) de 79.1 °C.

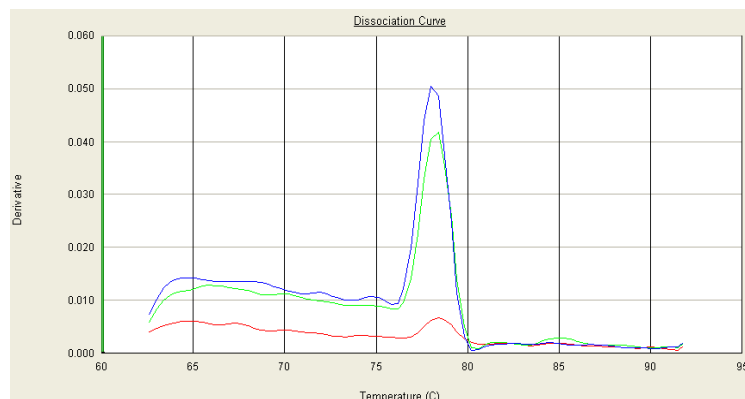


Figura 16. Curva de disociación del producto de amplificación de a HO-2. Se observa un solo pico a una  $T_m$  de 79.1 °C a diferentes diluciones de ADNc.

### 3. Validación del método de RT-PCR en tiempo real.

Para poder llevar a cabo una adecuada cuantificación génica de la HO-2 se realizó la validación del método de PCR en tiempo real utilizando el método de  $\Delta Ct$ . Se realizó una dilución seriada de ADNc del gen HO-2 y ARNr 18S (gen constitutivo) y se graficaron los valores de Ct obtenidos para cada dilución (figura 17).

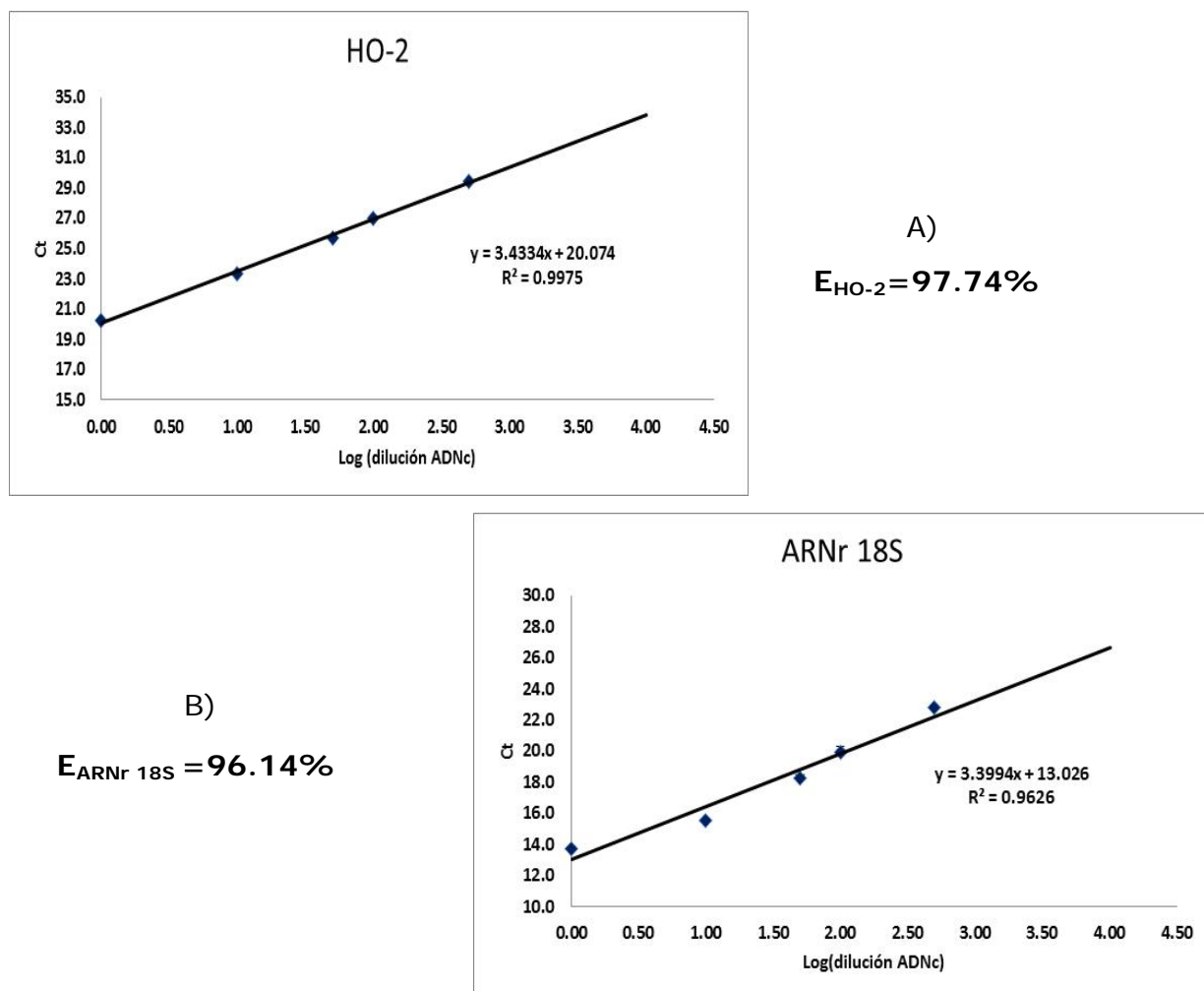


Figura 17. Eficiencias de la amplificación por RT-PCR en tiempo real de los genes HO-2 (A) y ARNr18S (B).

El método de validación requiere que la eficiencia de amplificación (E) sea  $100 \pm 5\%$  e iguales para ambos genes. Otro de los parámetros de validación es obtener los  $\Delta Ct$  ( $Ct_{HO-2} - Ct_{ARNr\ 18S}$ ) graficados contra el logaritmo de cada dilución ADNc (figura 18) donde la pendiente de la recta deber ser  $\leq 0.1$ .



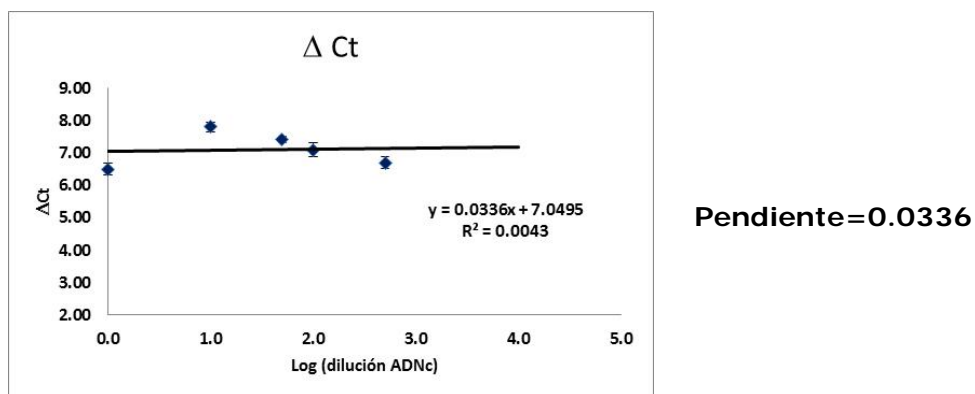


Figura 18.  $\Delta Ct$  versus logaritmo de la dilución de ADNc. La pendiente de la recta (0.0336) es  $\leq 0.1$ .

De acuerdo a las eficiencias de amplificación de la HO-2 (97.74%), el ARNr 18S (96.14%) y la pendiente de la gráfica  $\Delta Ct$  versus logaritmo de la dilución de ADNc (0.0336) se determinó en qué rango de dilución de ADNc se compararon la expresión de ARNr 18S y HO-2 y comparar en la expresión de la HO-2 en los diferentes grupos experimentales de manera confiable y válida.

El método de  $\Delta Ct$  es un método matemático para analizar los cambios relativos de la expresión de transcritos de un gen por PCR en tiempo real. El cálculo de la expresión relativa del transcrito de la HO-2 expresada como número de veces se calculó comparando directamente los Cts de la HO-2 y los Cts del gen ARNr 18S para cada muestra ( $\Delta Ct$ ), y posteriormente se compararon los  $\Delta Ct$ s de la muestras con respecto a la muestra control utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa (número de veces)} = 2^{-\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control}}$$

#### 4. Niveles transcripcionales de la HO-2 ante la isquemia-reperfusión.

Los cambios de expresión a nivel de ARNm de la HO-2 en un modelo de isquemia-reperfusión a través de la oclusión de la ACM en ratas se determinaron por PCR en tiempo real a través del método  $\Delta Ct$  en corteza y estriado (figura 19).

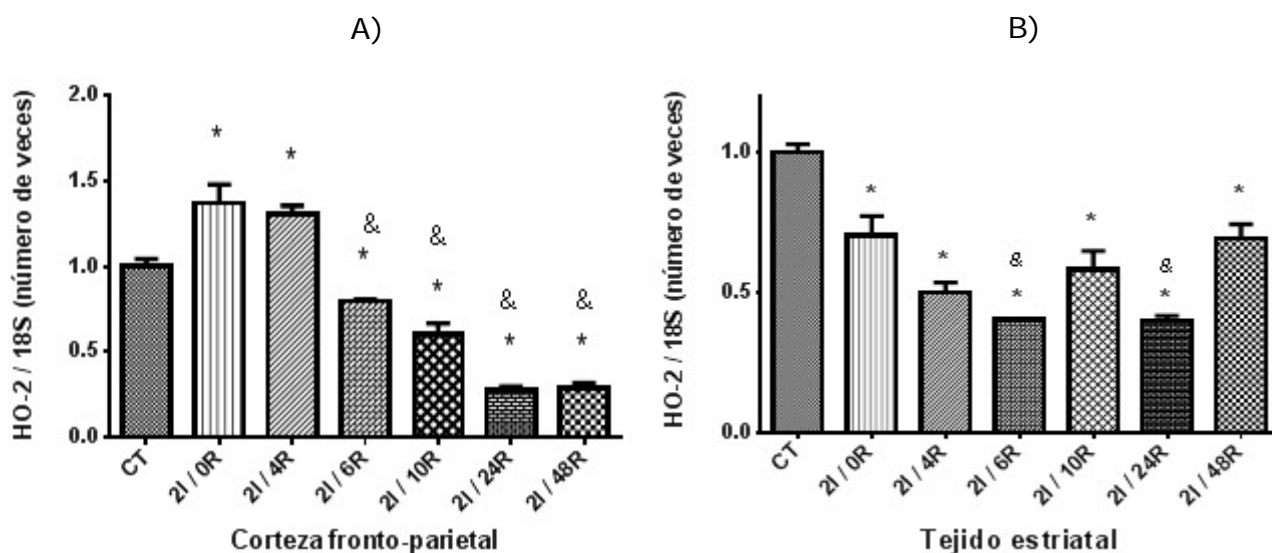


Figura 19. Expresión relativa del ARNm de la HO-2 en un curso temporal de 2 horas de isquemia (I) con 0, 4, 6, 10, 24, 48 horas de reperusión (R) en corteza fronto-parietal (A) y tejido estriatal (B). Los valores se expresan como la media  $\pm$  D.E (n=10). \*P<0.05 vs Control (CT) y & P<0.05 2I/XR vs 2I/0R utilizando la herramienta estadística ANOVA-Dunnet.

La expresión relativa del transcrito de la HO-2 en la corteza fronto-parietal muestra un aumento significativo a las 2 h de isquemia sin reperusión (0.4 veces) manteniéndose estos niveles a las 2I/4R con respecto al control. Sin embargo a las 6 h de reperusión (2I/6R), se percibe un descenso significativo (0.2 veces), teniendo un comportamiento decreciente hasta las 24 h de reperusión (2I/24R) (0.7 veces), manteniéndose hasta las 48 h de reperusión (2I/48R). En el caso del tejido estriatal, se observa una disminución en la expresión del transcrito de la HO-2 a partir de las 2 horas de isquemia (2I/0R) de 0.3 veces con respecto al control. En los tiempos de reperusión de 10 h y 48 h, se observa una recuperación parcial de los niveles de ARNm de la HO-2.

## 5. Niveles proteicos de la HO-2 ante la isquemia-reperusión.

Se evaluó la expresión a nivel de proteína por *western blot* con la finalidad de determinar si los cambios observados en el transcrito se observan en el producto proteico. Los resultados se observan en la figura 20.

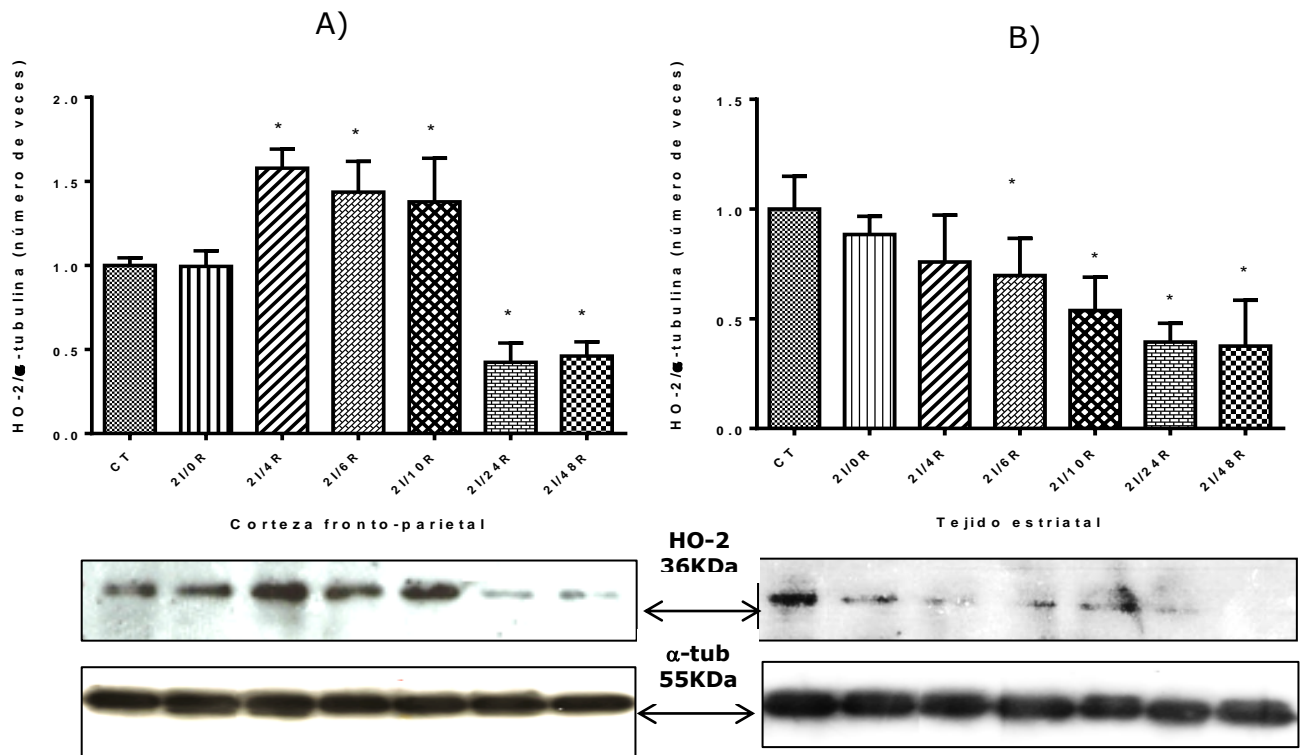


Figura 20. Análisis densitométrico para la expresión de la HO-2 en un curso temporal de 2 horas de isquemia (I) con 0, 4, 6, 10, 24, 48 horas de reperusión (R) en corteza fronto-parietal (A) y tejido estriatal (B). Los valores se expresan como la media  $\pm$  D.E (n=4). \*P<0.05 vs Control (CT) utilizando la herramienta estadística ANOVA-Dunnet.

La expresión relativa de la proteína de la HO-2 en corteza fronto-parietal presenta un aumento significativo con respecto al control a las 2 h de isquemia con 4 h de reperusión (2I/4R) de 0.57 veces manteniéndose con estos niveles hasta las 10 h de reperusión (2I/10R). Sin embargo a las 24 y 48 h de reperusión (2I/24R y 2I/48R), se percibe un descenso significativo (0.53 veces). En el caso del tejido estriatal, los niveles de proteicos de la HO-2 disminuyen a partir de las 2 horas de isquemia sin reperusión (0.22 veces) con respecto al control, aunque no es estadísticamente significativo; alcanzando una disminución de hasta 0.57 veces a las 48 h de reperusión (2I/48R) (figura 20).

## 6. Determinación de la actividad enzimática del sistema HO ante la isquemia-reperusión

La actividad enzimática se determinó por el método de la producción de BR que se produce por acción del sistema HO y la BVR. La determinación de la actividad enzimática del sistema HO, representa la actividad de la HO-1 y HO-2 acoplada con BVR para formar BR.

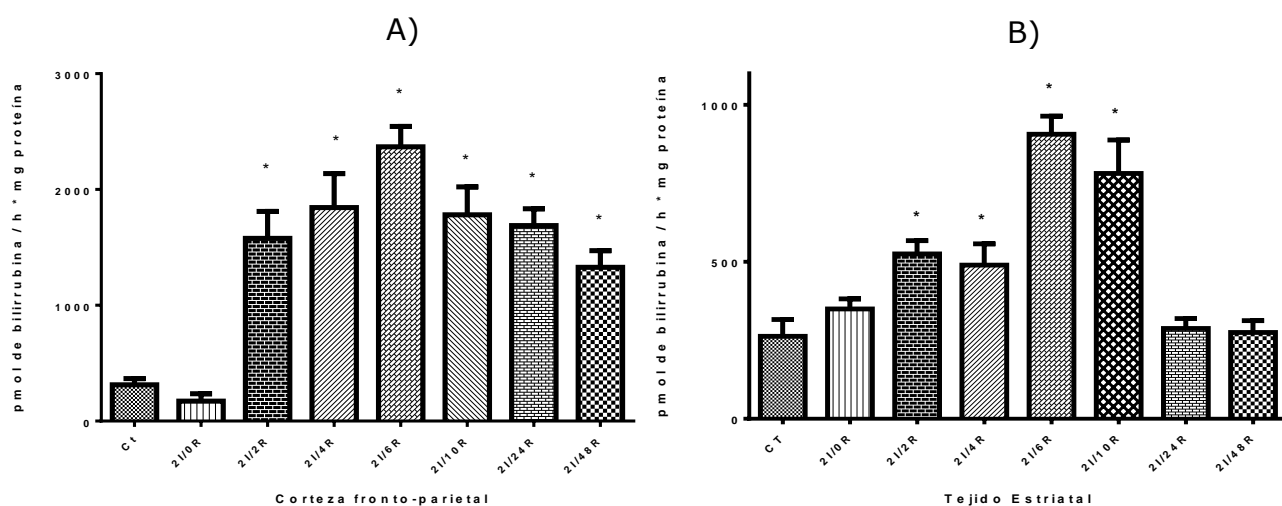


Figura 21. Actividad enzimática del sistema HO acoplada a una reacción secundaria mediada por la Biliverdina Reductasa en un curso temporal de 2 horas de isquemia (I) con 0, 2, 4, 6, 10, 24, 48 horas de reperusión (R) en corteza fronto-parietal (A) y tejido estriatal (B). Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM (n=4-5). \*P<0.05 vs 2I/0R, utilizando la herramienta estadística ANOVA-Dunnet.

Los resultados de actividad se presentan en la figura 21. Se observa que la actividad enzimática en corteza no tiene cambios sometida únicamente a isquemia (2I/0R). Sin embargo la actividad enzimática incrementa significativamente (5 veces) a partir del periodo con 2 h de isquemia y 2 h de reperusión (2I/2R) con respecto a 2I/0R. El pico máximo de actividad se observa a las 6 h de reperusión (2I/6R) de 7.6 veces. A partir de las 10 h de reperusión (2I/10R), la actividad comienza a descender, sin embargo esta actividad permanece significativamente alta con respecto a las ratas que no tienen el fenómeno de la reperusión.

Con respecto al tejido estriatal se observa que el periodo de solo isquemia (2I/0R) no presenta un cambio significativo. Sin embargo a las 2 h de reperusión (2I/2R) la actividad aumenta significativamente (1.5 veces) con respecto al grupo de 2I/0R, teniendo un pico máximo a 2I/6R (2.6 veces). A las 10 h de reperusión (2I/10R) comienza a observarse un pequeño decremento en la actividad enzimática, pero a las 24 y 48 h de reperusión (2I/24R y 2I/48R) existe un decremento considerable de la actividad enzimática, regresando de nuevo a los niveles basales. La actividad enzimática en tejido estriatal muestra menores incrementos que en corteza.

## IX. DISCUSIÓN

La isquemia cerebral es un fenómeno complejo y dinámico en términos bioquímicos y moleculares. Las alteraciones que se producen en las células (tanto en neuronas como en glía y en elementos vasculares de la microcirculación en la zona afectada) ocurren de manera secuencial a lo largo de un tiempo que depende de la gravedad de la isquemia, de que ésta sea permanente o transitoria y de que se apliquen o no medidas terapéuticas dirigidas a proteger el tejido afectado. Conocer cuáles son los trastornos fisiopatológicos responsables del daño por isquemia cerebral, así como su perfil temporal, es fundamental para poder aplicar tratamientos eficaces, farmacológicos o no farmacológicos, que protejan el tejido cerebral de los efectos letales de la isquemia. La inducción de isquemia cerebral focal por oclusión de la ACM en ratas, representa el modelo más cercano de lo que ocurre en las personas que presentan dicho padecimiento (Taoufik & Probert, 2008). Además que es un modelo ampliamente utilizado debido a su reproducibilidad (Durukan & Tatlisumak, 2007).

Teniendo en cuenta que existen umbrales de flujo sanguíneo en una isquemia cerebral y en la formación del núcleo y la penumbra isquémica, ésta última es de gran interés en la práctica médica. En esta zona se produce un daño funcional reversible pero es potencialmente viable ya que es la región donde las células modulan la cadena de eventos de la cascada isquémica a través de mecanismos moleculares que llevan a la supervivencia o daño celular determinando su conversión a núcleo isquémico. No debemos olvidar que todos los trastornos bioquímicos por daño isquémico se desencadenan de manera secuencial, pero no necesariamente organizada ni rígida y que en función de distintas circunstancias se modifica la expresión relativa de alguno de los mediadores de lesión frente a los mediadores de supervivencia, ya que todos están relacionados a través de distintas vías de señalización.

La restauración del FSC, es el primer paso lógico en el tratamiento de la isquemia, pero se ha podido comprobar que si esta normalización no se produce con relativa rapidez, la reperfusión no resulta suficiente para inhibir los mediadores de la cascada isquémica e incluso puede potenciarlos

(Kuroda & Siesjö, 1997), facilitando la progresión de la lesión hasta la muerte celular y la extensión del área de infarto (García JH., 1992).

Recientemente, se ha aceptado que la sobreexpresión de la HO-1 ocurre como respuesta a una multitud de factores que generan estrés oxidante. Esta sobreexpresión provee protección antioxidante en una gran variedad de células y tejidos (Abraham & Kappas, 2008), confiriendo neuroprotección en diferentes modelos de daño inducido por diferentes mecanismos. Aunque en condiciones fisiológicas la expresión de la HO-1 es casi indetectable y se limita sólo a algunas poblaciones neuronales, bajo condiciones patológicas se incrementa dramáticamente (Cuadrado & Rojo, 2008). Como antecedentes del papel que juega el sistema HO frente a un evento de isquemia-reperfusión, el trabajo de Aztatzi SE., (2011), demostró que la expresión del ARNm de la HO-1 tuvo un incremento gradual en corteza y estriado a partir de las 2 h de isquemia con 2 h de perfusión teniendo un pico máximo a las 2 h isquemia con 48 h perfusión. A nivel de proteína, demostró una sobreexpresión de la HO-1 a las 2 horas de isquemia con 24 h de perfusión. Por lo tanto, la sobreexpresión de la HO-1 es indicativa de una respuesta celular frente a un evento de isquemia-reperfusión para aminorar el daño oxidante. Sin embargo, en relación a la HO-2 se desconocía su respuesta ante un evento de isquemia-reperfusión.

La HO-2 ha atraído la atención de varios grupos de investigación debido a que el trabajo con animales genéticamente modificados ha revelado evidencia que apoya que la HO-2 es un agente protector. Debido a que es la isoenzima que se encuentra en altas concentraciones en cerebro y siendo la fuente primaria de defensa ante un estrés oxidativo, se le ha atribuido un papel importante en la neuroprotección ante estímulos de daño como la isquemia y daño hemorrágico cerebral con ratones *knock-out* para la HO-2 (Parfenova & Leffler, 2008). Por ejemplo, la pérdida de la actividad de la HO-2 a través de ratones *knock-out* (HO-2<sup>-/-</sup>), presentan mayores alteraciones como problemas de fertilidad, obesidad, hipertensión y resistencia a la insulina en contraste con los ratones deficientes en HO-1 (Sodhi et al., 2009). También son ratones que presentan una mayor susceptibilidad al daño por la isquemia inducida al ocluir la ACM, ya que

presentan una lesión de infarto de aproximadamente el doble que los ratones *wild-type* (Doré et al., 1999).

Por otro lado, mediante el uso de cultivos de células endoteliales provenientes de la vasculatura cerebral de ratones que no producen HO-2, se demostró que la HO-2 es un factor clave para la protección del endotelio cerebrovascular contra los cambios apoptóticos inducidos por glutamato o el TNF- $\alpha$  (Parfenova et al., 2006). En estos trabajos, las células endoteliales carentes de HO-2 presentaron una mayor susceptibilidad a la apoptosis y al estrés oxidante, por lo que se postuló que la HO-2 basal confiere citoprotección en un efecto que estaría relacionado con la producción de BR y CO.

Existen pocos estudios acerca del comportamiento de la expresión de la HO-2 a nivel de ARNm y proteína en varios estímulos de daño. Sin embargo, trabajos de investigación en modelos *in vivo* e *in vitro* han revelado que presenta una expresión diferencial dependiendo de las células, tejido y estímulo. Zhang y col. (2006), determinaron que la expresión de la HO-2 durante 48 h de hipoxia (1% de oxígeno), presentó una disminución a nivel de transcrito y proteína en 5 líneas celulares (Linfocitos T Jurkat, células de eritroleucemia YN-1 y K562, células HeLa, y células HepG2). He y col. (2010), observaron que en células endoteliales humanas expuestas a 16 h de hipoxia (1%) la HO-2 tuvo un decremento a nivel de ARNm sin ninguna alteración de los niveles proteicos. También observaron que a las 48 h de hipoxia, se presentó una recuperación de los niveles de ARNm de la HO-2 sin ningún cambio en el nivel de proteína. Lo sorprendente de este trabajo fue que a pesar de una reducción de los niveles de transcrito de HO-2 y la reducción de la síntesis total de proteína, los niveles de proteína de la HO-2 no se modificaron. Este fenómeno fue explicado a través de un perfil de polisomas, el cual reveló un aumento de asociación del transcrito de la HO-2 con polisomas durante la hipoxia, aumentando la traducción de la HO-2, razón por la cual los niveles de proteína no tuvieron ninguna modificación a pesar de la reducción de los niveles del transcrito.

Otra evidencia de que la HO-2 no es estrictamente constitutiva, fue a través del trabajo de Govindaraju y col. (2005), quienes determinaron que los niveles de proteína de la HO-2 aumentaron en endotelio aórtico de ratas

tras 16 h de hipoxia. Han y col. (2010), también demostraron un aumento en los niveles proteicos de la HO-2 en miocardio en ratones expuestos a hipoxia durante 28 días. Sutherland y col. (2009), demostraron que en condiciones de hipoxia isquémica, es decir un modelo que combina un evento de hipoxia e isquemia global, existe un aumento en la expresión de la HO-2 en células neuronales, gliales y endoteliales.

Los resultados de esta tesis indican que la HO-2 tiene una respuesta significativa en un evento de isquemia-reperfusión cerebral presentando cambios tanto a nivel de transcrito como de proteína en corteza fronto-parietal y tejido estriatal. A pesar de que ambos tejidos sufren los procesos de daño por la isquemia, la HO-2 tuvo una respuesta distinta. En corteza se observa que la HO-2 a las 2 h de isquemia con 4 h de perfusión existe un incremento a nivel de ARNm y proteína. Sin embargo, a pesar de que existe una reducción de los niveles de transcrito de la HO-2, la proteína se mantiene elevada hasta las 2 h de isquemia con 10 h de perfusión y posteriormente una disminución a las 2 h de isquemia con 24 y 48 h de perfusión (figura 19 A y figura 20 A).

En el caso del tejido estriatal, tanto los niveles de ARNm y proteína de HO-2, se mantuvieron bajos a partir de las 2h de isquemia sin perfusión (figura 19B y figura 20B). Probablemente estos resultados son debidos a que el tejido estriatal depende únicamente del FSC proveniente de la ACM, mientras que en corteza puede tener una circulación sanguínea colateral que le provee una mayor respuesta de adaptación ante un evento de isquemia. Por otro lado el parénquima que integra la región del estriado no incluye células endoteliales, mientras que en corteza integra un parénquima que incluye además de las células neuronales y gliales, células endoteliales vasculares. Se sabe que la HO-2 se expresa en altos niveles en endotelio, ayudando a contrarrestar los efectos dañinos en el parénquima (Govindaraju et al., 2005).

Existen evidencias de que la HO-2 posee mecanismos post-transcripcionales de estabilidad, de degradación y de eficiencia traduccional, siendo el transcrito de 1.3 kb el que se traduce con mayor eficiencia. Varios autores han establecido que la HO-2 tiene mecanismos de estabilidad transcripcional, aunque no han explicado de qué manera pueden modificar



la estabilidad y promover un incremento en los niveles de ARNm por varios estímulos, ya que el único elemento de respuesta transcripcional es mediado por glucocorticoides. Tampoco se sabe actualmente qué mecanismos moleculares son los responsables de un aumento en los niveles proteicos de la HO-2. El mecanismo que explica que los niveles de proteína de HO-2 se mantiene o incrementa es a través del aumento en la incorporación del transcrito en polisomas, aumentando la eficiencia traduccional de la HO-2. Otros autores han postulado que también puede ser a través de mecanismos de degradación (He et al., 2010).

Las nuevas investigaciones acerca de la HO-2 han causado una revolución en el conocimiento de la función y contribución en las señalizaciones celulares. Se ha observado que la sobreexpresión de los niveles proteicos de la BVR, induce la expresión de la HO-2. Actualmente se tiene información de que la BVR, además de ejercer la función catalítica de la conversión de biliverdina a bilirrubina, posee propiedades de una tirosina, treonina y serina cinasa. La BVR también tiene sitios de fosforilación directa por los receptores de IRK (receptor de insulina/IGF-1 cinasa) por lo que probablemente la inducción de la HO-2 por la sobreexpresión de la BVR está mediada por señalizaciones de fosforilación de la BVR (Ding et al., 2011). Por otro lado, existen evidencias entre la relación de la expresión de la HO-2 y la proteína p53. Se ha observado que células del músculo liso vascular en presencia de NO presentan una sobreexpresión de HO-2 a nivel de proteína en función del tiempo, sin cambios en los niveles de ARNm. Sin embargo, células *knock-out* para p53 en presencia de NO mostraron niveles detectables de HO-2. Por lo tanto el efecto protector de p53 ante los efectos tóxicos de NO está mediado por la regulación de la HO-2 (Kim et al., 2008). También se ha observado que el silenciamiento de la expresión de la HO-2 provoca una reducción en los niveles de proteína de la SOD extracelular (SOD-EC), un aumento proteico de la ASK-1 (cinasa 1 reguladora de la señal apoptótica) y un descenso de los niveles de la proteína Akt fosforilada (Akt-p). Estos hallazgos sugieren que la HO-2 es crítica para la regulación de la apoptosis y en el control de los niveles de la SOD-EC, Akt-p, y ASK-1 (Turkseven et., 2007). También se ha investigado en relación a la actividad enzimática de la HO-2. Se conoce actualmente que puede ser modificada a través de sitios de fosforilación (serina 79) mediada por la vía de

señalización de calmodulina/ $\text{Ca}^{2+}$  y CK2 y a través de las modificaciones redox de los HRMs (Yi L et al., 2009; Boehning et al, 2003).

Los resultados de actividad del sistema HO involucran la participación de la HO-1 y HO-2. El periodo de 2I/6R es el punto donde se presenta la máxima actividad enzimática en corteza y estriado, sin embargo el comportamiento de la actividad enzimática es distinto para los dos tejidos (figura 21). La actividad en corteza durante en este periodo alcanza un máximo de 2368.8 pmol de BR/ h\*mg de proteína, mientras que en tejido estriatal en este mismo periodo alcanza un valor de 903.3 pmol de BR/h\*mg de proteína. Con respecto a los periodos de 24 y 48 h de reperfusión (2I/24R y 2I/48R), el comportamiento de la actividad enzimática es totalmente distinto para cada tejido. En corteza se observa que se mantiene con una alta actividad enzimática con respecto al control, mientras que en estriado la actividad regresa a sus niveles basales. Este comportamiento es debido a que el tejido estriatal es más afectado por eventos de isquemia-reperfusión, ya que es la zona que depende directamente de la irrigación sanguínea de la ACM. La corteza es una zona que además de depender de la circulación sanguínea a través de la ACM, posee flujos sanguíneos colaterales permitiendo que pueda tener mayor respuesta de adaptación y sobrevivencia al daño de isquemia-reperfusión. Por otro lado, las diferencias de actividad enzimática en ambos tejidos pueden ser explicadas a través de la expresión de la HO-2. En estriado, la HO-2 tuvo un decremento a nivel de transcrito y proteína a partir de las 2 h de isquemia sin reperfusión (figura 19 B, 20 B). Esta disminución se sugiere que afecta la actividad enzimática del sistema HO a pesar de que la HO-1 a nivel de proteína tiene un pico máximo a las 24 h de reperfusión (2I/24R) (Aztatzi SE., 2011). De igual manera, en corteza se observa que a 2I/24R, la actividad no es el pico máximo de acuerdo a la expresión de la HO-1, ya que la proteína de la HO-2 en este periodo se encuentra en bajos niveles (figura 20 A) por lo que la actividad del sistema HO puede verse afectada. Se ha sugerido que los niveles de expresión de la HO-1 y HO-2 pudieran estar regulándose para mantener en homeostasis el grupo hemo intracelular, ya que en las señalizaciones intracelulares en condiciones de daño existen varias hemoproteínas que requieren de este grupo prostético

para llevar a cabo funciones celulares ya sea de respuesta adaptativa o de supervivencia.

Estos resultados sugieren que la expresión y la regulación del sistema HO juega un papel muy importante en la respuesta a la isquemia y en particular durante la reperfusión a través de sus metabolitos catalíticos (BV, CO, Fe<sup>2+</sup>) que son factores que participan en señalizaciones importantes como antioxidantes y en la neuroprotección.

## **X. CONCLUSIONES**

- Los datos que se presentaron en este trabajo sustentan que la HO-2 tiene respuesta diferencial en su expresión a nivel de ARNm y proteína en corteza y tejido estriatal en un modelo in vivo de isquemia-reperfusión cerebral. Por lo tanto la HO-2 no es una enzima estrictamente constitutiva.
- Se demostró por PCR en tiempo real que la expresión de la HO-2 presentó cambios significativos en corteza fronto-parietal y tejido estriatal de ratas sometidas a isquemia cerebral y diferentes tiempos de perfusión. En corteza presentó un aumento significativo a partir de 2 h de isquemia, manteniéndose este incremento hasta las 2 h de isquemia con 4 h de perfusión, posteriormente tuvo un decremento a partir de las 2 h de isquemia con 6 h de perfusión. En tejido estriatal, el transcrito de HO-2 tuvo un decremento a partir de las 2 h de isquemia manteniéndose niveles de expresión bajos en todos los periodos de perfusión.
- En el caso de la expresión a nivel de proteína se encontró que la HO-2 en corteza frontoparietal mostró un aumento con diferencia significativa a las 2 h de isquemia con 4 de perfusión, manteniéndose hasta las 2 h de isquemia con 10 h de perfusión. En tejido estriatal se observó que los niveles de proteína de HO-2 disminuyeron en función del periodo de perfusión.
- Se logró observar que el sistema HO responde ante un daño de isquemia-reperfusión a través del incremento en la actividad enzimática presentando un pico máximo a las 2 h de isquemia con 6 h de perfusión en corteza fronto-parietal y tejido estriatal.

## **XI. PERSPECTIVAS**

Actualmente, el laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez lleva a cabo investigaciones en relación a la importancia del sistema HO ante varios estímulos y modelos de daño. Es la primera vez que se presentan resultados por PCR en tiempo real para la HO-2, y a partir de la sensibilidad de esta técnica se pudo demostrar que la HO-2 tiene una respuesta diferencial frente a estímulos de isquemia-reperfusión en un modelo *in vivo* de oclusión de la ACM.

La cuantificación específica de la actividad del sistema HO ha sido un reto, ya que no se cuenta con un inhibidor específico para alguna de las isoenzimas de este sistema. Sin embargo, el grupo de Vlahakis y col. (2006), ha desarrollado compuestos derivados de imidazol-dioxolano como inhibidores específicos para el sistema HO. El compuesto Hidrocloruro de 2-[2-(4-clorofenil) etil]-2-[(1H-imidazol-1-il)metil]-4-metil-1,3-dioxolano ha presentado mayor selectividad en inhibir la HO-1. A partir del desarrollo de este inhibidor específico, se podrá investigar con mayor precisión la actividad específica de la HO-1 y de la HO-2 en procesos de daño celular y se podrá discernir qué papel juega la actividad enzimática de cada una de las isoenzimas ante un daño celular.

## **XII. REFERENCIAS**

Abraham NG & Kappas A. (2008). Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev.* 60: 79-127.

Adams JM & Cory S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences.* 26(1):61-6.

Aguilera-P, Vázquez-Contreras E, Gómez-Martínez CD & Chánez-Cárdenas ME. (2009). Hypoxia Inducible Factor-1 as a Therapeutic Target in Cerebral Ischemia. *Current Signal Transduction Therapy:* 4, 162-173.

Ahmad Z, Salim M & Maines MD. (2002). Human biliverdin reductase is a leucine zipper-like DNA-binding protein and functions in transcriptional activation of heme oxygenase-1 by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 277(11):9226-32

Alam J & Cook JL. (2007). How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(2):166-74.

Allen CL & Bayraktutan U. (2008). Risk factors for ischemic stroke. *Int J Stroke.* 3(2):105-116.

Aztatzi SE. (2011). Efecto de la isquemia y la reperfusión en la expresión del factor inducible por hipoxia y la hemoxigenasa 1 en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media. Tesis Lic. Químico Farmacéutico Biológico. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.

Babior BM. (2002). The leukocyte NADPH oxidase. *Isr. Med Assoc J.* 4(11):1023-4.

Baranano DE, Rao M, Ferris CD & Snyder SH. (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sc.* 99(25):16093-8.

Belcher JD, Beckman JD, Balla G, Balla J, & Vercellotti G. (2010). Heme degradation and vascular injury. *Antioxid Redox Signal* 12: 233–248.

Bergeron M, Ferriero DM & Sharp FR. (1998). Developmental expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* 105(2): 181-94.

Boehning D, Moon C, Sharma S, Hurt KJ, Hester LD, Ronnett GV, Shugar D & Snyder SH. (2003). Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *40*:129-137.

Brinker G, Franke C, Hoehn M, Uhlenkuken U & Hossmann KA. (1999). Thrombolysis of cerebral clot embolism in rat: effect of treatment delay. *Neuroreport*. 10(16):3269-72.

Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM & Soares MP. (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 192(7):1015-26.

Cabrera-Rayó A, Martínez-Olazo O, Laguna-Hernández G, Juárez-Ocaña R, Rosas-Barrientos V & Loria-Castellanos J. (2008). Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la Ciudad de México. Estudio multicéntrico. *Med Int Mex*. 24(2):98-103.

Candelario-Jalil E. (2008). Nimesulide as a promising neuroprotectant in brain ischemia: New experimental evidences. *Pharmacol Res*. 57(4):266-273.

Coople IM, Goldring CE, Kitteringham NR & Park BK, 2008. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology*. 246(1):24-33.

Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G & Moreau P. (1998). Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest*. 101(7):1530-1537.

Cuadrado A & Rojo AI. (2008). Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections. *Curr Pharm Des.* 14:429-442.

Cui J, Yang H, & Lee US. (2009). Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cell Mol Life Sci* 66: 852–875.

Curtin JF & Cotter TG. (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal.* 15(11):983-92.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y & Greenberg ME. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2):231-241.

Dennery PA. (2000). Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr. Top. Cell Regul.* 36:181– 199.

Díez-Tejedor E., Del Brutto O., Álvarez-Sabin J., Muñoz M. & Abiusi G. (2001). Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev Neurol.* 33(5):455-464.

Ding B, Gibbs PE, Brookes PS & Maines MD. (2011). The coordinated increased expression of biliverdin reductase and heme oxygenase-2 promotes cardiomyocyte survival: a reductase-based peptide counters  $\beta$ -adrenergic receptor ligand-mediated cardiac dysfunction. *FASEB J.* 25(1):301-13.

Dirnagl U, Iadecola C. & Moskowitz MA. (1999). Pathobiology of ischemic stroke: an integrative view. *Trends Neurosci.* 22(9):391-397.

Doré S, Sampei K, Goto S, Alkayed NJ, Guastella D, Blackshaw S, Gallagher M, Traystman RJ, Hurn PD, Koehler RC & Snyder SH. (1999). Heme oxygenase-2 is neuroprotective in cerebral ischemia. *Mol Med.* 5:656-663.



Durukan A & Tatlisumak T. (2007). Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodents models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav.* 87(1): 179-197.

Eltzsching HK & Eckle T. (2011). Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. *Nat Med.* 17(11):1391-1401.

Emerich DF, Dean III RL & Bartus RT. (2002). The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp Neurol.* 173(1):168-81.

Exner M, Minar E, Wagner O & Schillinger M. (2004). The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med.* 37(8):1097-104.

Favreau F, Petit-Paris I, Hauet T, Dutheil D, Papet Y, Mauco G & Tallineau C. (2004). Cyclooxygenase 1-dependent production of F2-isoprostane and changes in redox status during warm renal ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 36(8):1034-42.

Fraser PA. (2011). The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Free Radic Biol Med.* 51(5):967-977.

García JH. (1992). The evolution of brain infarcts. A review. *J Neuropathol Exp Neurol.* 51:387-393.

Gerber U, Gee CE & Benquet P. (2007). Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol.* 7(1):56-61.

Ginsberg MD. (1996). The validity of rodent brain-ischemia models is self-evident. *Arch Neurol.* 53(10):1065-1067.

Govindaraju V, Teoh H, Hamid Q, Cernacek P & Ward ME. (2005). Interaction between heme oxygenase-2 and endothelin-1 in altered aortic

reactivity after hypoxia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H962-H970.

Granger DN. (1999). Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*. 6(3):167-78.

Green AR, Odergren T & Ashwood T. (2003). Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol Sci*. 24(8):402-408.

Haga Y, Tempero MA & Zetterman RK. (1996). Unconjugated bilirubin inhibits in vitro major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1316 (1):29–34

Halliwel B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of Neurochemistry*. 97(6):1634-58.

Han F, Takeda K, Ono M, Date F, Ishikawa K, Yokoyama S, Shinozawa Y, Furuyama K & Shibahara S. (2010). Hypoxemia induces expression of heme oxygenase-1 and heme oxygenase-2 proteins in the mouse myocardium. *J Biochem*. 147(1):143-51

Hawkins BT & Davis TP. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 57(2):173-185.

Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, & Noguchi M. (2004). Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*. 336(2):241-50.

He JZ, Ho JJ, Gingerich S, Courtman DW, Marsden PA & Ward ME. (2010). Enhanced translation of heme oxygenase-2 preserves human endothelial cell viability during hypoxia. *J Biol Chem*. 285(13):9452-61.

Hon T, Hach A, Lee HC, Cheng T & Zhang L. (2000). Functional analysis of heme regulatory elements of the transcriptional activator Hap1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 584–591

INEGI. Estadísticas de mortalidad. Consulta interactiva de datos.

Immenschuh S & Ramadori G. (2000). Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol.* 60(8):1121-8.

Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F & Neckers LM. (2002). Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha degradative pathway. *J. Biol Chem.* 277:33 29936–29944.

Jaiswal AK. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 36(10):1199-207.

Juurlink BH & Sweeney MI. (1997). Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neurosci. and Biobeh. Rev.* 21(2):121-128.

Kaminska B, Pyrzynska B, Ciechomska I & Wisniewska M. (2000) Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 60(3):395-402.

Kikuchi G, Yoshida T & Noguchi M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 338(1):558-67.

Kim YM, Chung HT, Simmons RL & Billiar TR (2000) Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.* 275, 10954-10961.

Kim YM, Choi BM, Kim YS, Kwon YG, Kibbe MR, Billiar TR & Tzeng E. (2008). Protective effect of p53 in vascular smooth muscle cells against nitric oxide-induced apoptosis is mediated by up-regulation of heme oxygenase-2. *BMB Rep.* 41(2):164-9.

Kohen R & Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30(6):620-650

Kumar S & Bandyopadhyay U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett.* 157:175-188.

Kuroda S & Siesjo BK. (1997). Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci.* 4:199-212

Lakhan SE, Kirchgessner A & Hofer M. (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med.* 7:97-108.

Leciñana M, Díez-Tejedor E, Carceller F & Roda JM. (2001). Cerebral ischemia: from animal studies to clinical practice. Should the methods be reviewed?. *Cerebrovasc Dis.* 11 Suppl 1:20-30.

Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ & Choi DW. (2000). Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest.* 106(6):723-731.

Lee HC, Hon T, Lan C & Zhang L. (2003). Structural environment dictates the biological significance of heme-responsive motifs and the role of Hsp90 in the activation of the heme activator protein Hap1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5857–5866

Lewandowski CA, Rao CPV. & Silver B. (2008). Transient Ischemic Attack: Definition and Clinical Presentation. *Ann Emerg Med.* 52(2):S17-S16.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivascular SM, Ahmad M, Alnemri ES & Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91(4):479-89.

Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J & Kroemer G. (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase- independent effector of cell death. *Cell Death Differ.* 6(6):516-24.

Macrae IM, Robinson MJ, Graham DI, Reid JL & McCulloch J. (1993). Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course and neuropathological consequences. *J Cereb Blood Flow Metab.* 13(2):276-84

Maines M.D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:517–554.

Maines MD. (2000). The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Molec Biol.* 46(3):573-85.

Mancuso C & Barone E. (2009). The heme oxygenase/biliverdin reductase pathway in drug research and development. *Curr Drug Metab.* 10(6):579-94.

Margaill I., Plotkine M. & Lerouet D., (2005). Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med.* 39(4):429-443.

Markus HS. (2011). Stroke genetics. *Hum Mol Genet.* 20(R2):R124-R131.

Matthew BM., & Joseph ES. (2009). Ischemic Stroke: Pathophysiology and Principles of Localization. *Neurology Board Review Manual.* 13(1): 1-14.

McAuley MA. (1995). Rodent models of focal ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 7(2):153-80.

McCoubrey WK Jr & Maines MD. (1993). Domains of rat heme oxygenase-2. The amino terminus and histidine 151 are required for catalytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 302(2):402-8.

McCoubrey WK Jr, Eke B & Maines MD. (1995). Multiple transcripts encoding HO-2 in rat testis: Developmental and cell specific regulation of transcripts and protein. *Biol. Reprod.* 53(6):1330-8.

Medeiros MH. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas, ed., Manual moderno-México.* pag. 119-134.

Medema JP, Scaffidi C, Krammer PH & Peter M E. (1998). Bcl-xL acts downstream of caspase-8 activation by the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* 273(6):3388-3393.

Mehta SL, Manhas N. & Raghubir R. (2007). Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 54(1):34-66.

Mergenthaler P, Dirnagl U & Meisel A. (2004). Pathophysiology of Stroke: Lessons From Animal Models. *Metab Brain Dis.* 19(3-4):151-167.

Mhairi MI. (1992). New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol.* 34(4):302-8.

Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA & Choi AM. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* 6(4):422-428.

Parfenova H & Leffler CW. (2008). Cerebroprotective functions of HO-2. *Curr Pharm Des.* 14:443-453.

Parfenova H, Basuroy S, Bhattacharya S, Tcheranova D, Qu Y, Regan RF & Leffler CW. (2006). Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290:1399-1410.

Phan TG, Wright PM, Markus R, Howells DW, Davis SM & Donnan GA. (2002). Salvaging the ischaemic penumbra: more than just reperfusion? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29: 1-10.

Purves D, Augustine GA, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia AS, McNamara JO & Williams SM. (2007). *Neuroscience*. 5<sup>th</sup> edition, Sinauer Associates: Sunderland, MA.

Ragsdale SW & Yi L. (2011). Thiol/Disulfide Redox Switches in the Regulation of Heme Binding to Proteins. *Antioxidants & redox signaling.* 14(6):1039-47.

Raju VS, McCoubrey Jr WK & Maines MD. (1997). Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim Biophys Acta.* 1351(1-2):89-104

Robbins, Kummar, Abbas, Fausto & Mitchell. (2005). *Patología estructural y funcional*. 7<sup>a</sup> edición. Barcelona España. Elsevier. Pag.1353-1355.

Roberts GP, Youn H & Kerby RL. (2004). Review CO as a cellular signaling molecule. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(3):453-73.

Rodrigo J, Fernández AP, Serrano J, Peinado MA & Martínez A. (2005). The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med.* 39(1):26-50.

Rotenberg MO & Maines MD. (1991). Characterization of a cDNA encoding rabbit brain heme oxygenase-2 and identification of a conserved domain among mammalian heme oxygenase isozymes: possible heme-binding site? *Arch. Biochem. Biophys.* 290(2):336-44.

Ryter SW & Tyrrell RM. (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 15;28(2):289-309.

Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Kaczmarek E, Ritter T, Volk HD, & Tiegs G. (2003). Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology*. 38(4):909-18.

Schaller B & Graf R. (2004). Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiology concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 24(4):351-371.

Schipper HM. (2000). Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Exp. Gerontol*. 35(6-7):821-30.

Schipper HM (2004). Brain iron deposition and the free radical mitochondrial theory of ageing. *Ageing Res Rev*. 3: 265-201, 2004.

Sedlak TW & Snyder SH. (2004). Review Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics*. 113(6):1776-82.

Serracino-Inglott F, Habib NA & Mathie RT. (2001). Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*. 181 (2): 160-166.

Shan Y, Lambrecht RW, Donohue SE & Bonkovsky HL (2006). Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J*. 20(14):2651-3

Sharp FR, Ran R, Lu A, Tang Y, Strauss KI, Glass T, Ardizzone T & Bernaudin M. (2004). Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *Neuro Rx*. 1(1):26-35

Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J & Graham DI. (1985). Recirculation model following MCA occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability and brain edema. *J Neurosurg*. 63(2):272-7.



Siesjö BK. (2008). Pathophysiology and treatment of focal ischemia. Part I: Pathofisiology. *J Neurosurg.* 177:169-184.

SINAIS. <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/> (consultado el día 3 de noviembre del 2012)

Siomek A. (2012). NF- $\kappa$ B signaling pathway and free radical impact. *59(3):323-31.*

Sodhi K, Inoue K, Gotlinger KH, Canestraro M, Vanella L, Kim DH, Manthathi VL, Koduru SR, Falck JR, Schwartzman ML & Abraham NG. (2009). Epoxyeicosatrienoic acid agonist rescues the metabolic syndrome phenotype of HO-2-null mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 331(3):906-16.

Sun Y, Rotenberg MO & Maines MD. (1990). Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain: Two HO-2 mRNAs are detected. *J Biol Chem.* 265(14):8212-8217.

Sutherland BA, Rahman RM, Clarkson AN, Shaw OM, Nair SM & Appleton I. (2009). Cerebral heme oxygenase 1 and 2 spatial distribution is modulated following injury from hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci Res.* 65(4):326-34.

Szydlowska K & Tymianski M. (2010). Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 47(2):122-129.

Tang XD, Xu R, Reynolds MF, Garcia ML, Heinemann SH, & Hoshi T. (2003). Haem can bind to and inhibit mammalian calcium- dependent Slo1 BK channels. *Nature.* 425: 531–535.

Taoufik E & Probert L. (2008). Ischemic Neuronal Damage. *Curr Pharm Des.* 14(33):3565-3573.

Tomai F, Crea F, Chiariello L & Gioffrè PA. (1999). Ischemic preconditioning in humans: models, mediators and clinical relevance. *Circulation*. 100(5):559-63.

Turkseven S, Drummond G, Rezzani R, Rodella L, Quan S, Ikehara S & Abraham NG. (2007). Impact of silencing HO-2 on EC-SOD and the mitochondrial signaling pathway. *J Cell Biochem*. 100(4):815-23.

Uluç K, Miranpuri A, Kujoth GC, Aktüre E & Başkaya MK. (2011). Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Vis Exp*. (48). pii: 1978. doi: 10.3791/1978.

Vitek L & Schwertner HA. (2007). The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv.Clin.Chem*. 43, 1–57.

Vlahakis JZ, Kinobe RT, Bowers RJ, Brien JF, Nakatsu K & Szarek WA. (2006). Imidazole-dioxolane compounds as isozyme-Selective heme oxygenase inhibitors. *J Med Chem*. 49(14):4437-41.

Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ & Figdor CG. (2003). Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev*. 55(3):551-71

Wilks A, Ortiz de Montellano PR, Sun J & Loehr TM. (1996). Heme oxygenase (HO-1): His-132 stabilizes a distal water ligand and assists catalysis. *Biochemistry*. 35(3):930-6.

Wu TW, Fung KP & Yang CC (1994). Unconjugated bilirubin inhibits the oxidation of human low density lipoprotein better than Trolox. *LifeSci*. 54, 477–481; 1994

Yi L, Jenkins PM, Leichert LI, Jakob U, Martens JR, & Ragsdale SW. (2009). The heme regulatory motifs in heme oxygenase-2 form a thiol/disulfide

redox switch that responds to the cellular redox state. *J Biol Chem.* 284: 20556–20561

Yi L & Ragsdale SW. (2007). Evidence that the heme regulatory motifs in heme oxygenase-2 serve as a thiol/disulfide redox switch regulating heme binding. *J Biol Chem.* 282: 20156– 21067.

Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S & Cummings R (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20(1):84-91.

Zenteno ST & Saldaña BY. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas, ed., Manual moderno-México.* Pag. 135-146.

Zhang Y, Furuyama K, Kaneko K, Ding Y, Ogawa K, Yoshizawa M, Kawamura M, Takeda K, Yoshida T, Shibahara S. (2006). Hypoxia reduces the expression of heme oxygenase-2 in various types of human cell lines. A possible strategy for the maintenance of intracellular heme level. *FEBS J.* 273(14):3136-47.

Ziello JE, Jovin IS & Huang Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med.* 80(2):51-60.